

Université de Sherbrooke

Rôles et régulation des tyrosine kinases Src dans la survie entérocytaire humaine

Par
Véronique Bouchard
Anatomie et biologie cellulaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé
en vue de l'obtention du grade de
maître ès sciences (M.Sc.)
en biologie cellulaire

22 août 2005



Library and
Archives Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Published Heritage
Branch

Direction du
Patrimoine de l'édition

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

ISBN: 978-0-494-17282-7

Our file Notre référence

ISBN: 978-0-494-17282-7

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.


Canada

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES	ii
LISTE DES ILLUSTRATIONS ET DES TABLEAUX	ix
ABRÉVIATIONS ET SYMBOLES	xiii
RÉSUMÉ	xviii

I-INTRODUCTION

1. APOPTOSE	1
1.1 Caractéristiques générales et morphologiques de l'apoptose.....	1
1.2 Phases décisionnelle et effectrice de l'apoptose : les principaux acteurs	2
1.2.1 Les homologues Bcl-2	4
1.2.2 Les caspases	4
1.2.3 L'apoptosome et le contrôle de la phase décisionnelle par les homologues Bcl-2	5
2. LES VOIES DE SIGNALISATION IMPLIQUÉES DANS LA SURVIE CELLULAIRE ET/OU DANS L'APOPTOSE	6
2.1 La voie de la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K)	7
2.1.1 Akt : principal effecteur de la PI3-K dans la promotion de la survie ...	9
2.2 La voie des MEK/Erk.....	9
2.3 Les MAPK de stress (SAPK) : p38 et JNK.....	12

3. LES INTÉGRINES ET LEURS IMPLICATIONS DANS LA RÉGULATION DE LA SURVIE CELLULAIRE ET/OU DE L'ANOÏKOSE	12
3.1 Anoïkose	12
3.2 Les intégrines	13
3.3 La transmission de signaux par les intégrines.....	14
3.3.1 La signalisation intégrines-Fak	16
4. LES TYROSINE KINASES MEMBRES DE LA FAMILLE SRC (TKS SRC)	17
4.1 Les domaines protéiques des TKs Src	18
4.2 L'activation des TKs Src et leur régulation	20
4.3 Implications des TKs Src dans les divers processus cellulaires.....	22
4.3.1 Les TKs Src et la signalisation par les intégrines : implication dans la survie.....	24
4.3.1.1 Interactions Fak-TKs Src	25
4.4 Les TKs Src et le cancer	26
4.5 Implications distinctes des TKs Src	27
5. L'ÉPITHÉLIUM INTESTINAL.....	28
5.1 Mécanismes de régulation de la survie et de l'apoptose/anoïkose distincts selon l'état de différenciation entérocytaire.....	30
5.1.1 Expression différentielle des homologues Bcl-2 le long de l'axe crypte-villosité.....	32
5.1.2 La voie PI3-K/Akt et l'état de différenciation des cellules épithéliales intestinales.....	33

5.1.3	Implication différentielle de la voie MEK/Erk dans la survie des cellules épithéliales intestinales selon leur état de différenciation	34
5.1.4	Les isoformes de p38 et l'état de différenciation des cellules épithéliales intestinales	35
5.1.5	Fak, les intégrines et l'état de différenciation des cellules épithéliales intestinales.....	35
5.2	Les TKs Src et l'épithélium intestinal.....	37
6.	MODÈLES CELLULAIRES DE DIFFÉRENCIATION ÉPITHÉLIALE INTESTINALE <i>IN VITRO</i>	39
7.	HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS	42

II-MATÉRIELS ET MÉTHODES

1.	CULTURE CELLULAIRE.....	44
2.	INCUBATION AVEC LES DIFFÉRENTS INHIBITEURS	45
2.1	Inhibiteurs pharmacologiques utilisés.....	46
3.	MISE EN ÉVIDENCE DE L'APOPTOSE PAR ISEL	47

4. ANALYSES PAR IMMUNOPRÉCIPITATION ET IMMUNOBUVARDAGE (WESTERN BLOT).....	49
4.1 Préparation des échantillons pour Western Blot	49
4.2 Électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE).....	50
4.3 Immunodétection des protéines (Western Blot).....	51
4.4 Préparation des échantillons pour immunoprécipitation	52
4.5 Immunoprécipitation (et co-immunoprécipitation).....	53
4.6 Anticorps utilisés.....	54
4.6.1 Anticorps primaires utilisés	54
4.6.2 Anticorps secondaires utilisés.....	55
4.7 Déshybridation des membranes	56
4.8 Analyses densitométriques.....	56
5. ANALYSES STATISTIQUES	57

III-RÉSULTATS

1. LES NIVEAUX RELATIFS D'EXPRESSION DES TYROSINE KINASES MEMBRES DE LA FAMILLE SRC (TKS SRC) VARIENT AU COURS DE LA DIFFÉRENCIATION DES CELLULES ÉPITHÉLIALES INTESTINALES	58
2. LES NIVEAUX RELATIFS D'ACTIVATION DES TYROSINE KINASES MEMBRES DE LA FAMILLE SRC (TKS SRC) VARIENT AU COURS DE LA DIFFÉRENCIATION DES CELLULES ÉPITHÉLIALES INTESTINALES	64

3. LES CELLULES ÉPITHÉLIALES INTESTINALES ENTRENT EN APOPTOSE LORS DE L'INHIBITION DES TKS SRC	69
3.1 Les cellules épithéliales intestinales entrent en apoptose lorsque l'activité catalytique des TKS Src est inhibée par le PP2	70
3.2 Les cellules épithéliales intestinales entrent en apoptose lorsque l'activité catalytique des TKS Src est inhibée par l'herbimycine A.....	72
4. LES IMPACTS SUR LES NIVEAUX RELATIFS D'ACTIVATION DES TKS SRC LORS DE L'INHIBITION DE L'ACTIVITÉ CATALYTIQUE DES TKS SRC PAR LE PP2 OU L'HERBIMYCINE A	75
5. LES IMPACTS SUR LES NIVEAUX RELATIFS D'ACTIVATION DES TKS SRC LORS DE L'INHIBITION DE FAK OU DE LA SIGNALISATION INTÉGRINES-FAK	80
6. LES IMPACTS SUR LES NIVEAUX RELATIFS D'ACTIVATION DE FAK LORS DE L'INHIBITION DE L'ACTIVITÉ CATALYTIQUE DES TKS SRC	85
7. LES INTERACTIONS ENTRE LES TKS SRC ET FAK PEUVENT ÊTRE AFFECTÉES PAR L'INHIBITION DES TKS SRC, DE FAK OU DE LA SIGNALISATION INTÉGRINES-FAK	87
8. LES CELLULES HIEC ET L'HERBIMYCINE A	93

IV-DISCUSSION

1. DISTINCTIONS DANS LES PROFILS D'EXPRESSION ET D'ACTIVATION ENTRE LES TROIS TKS SRC SELON L'ÉTAT DE DIFFÉRENCIATION DES CELLULES ÉPITHÉLIALES INTESTINALES	94
2. IMPLICATIONS DES TKS SRC DANS LES MÉCANISMES DE SURVIE DES CELLULES ÉPITHÉLIALES INTESTINALES, MAIS DES SUSCEPTIBILITÉS À ENTRER EN APOPTOSE DISTINCTES SELON L'ÉTAT DE DIFFÉRENCIATION	98
2.1 Lors de l'inhibition de leur activité kinase, l'activation de chacune des TKs Src est affectée distinctement selon l'état de différenciation.	101
3. LES TKS SRC ET LA SIGNALISATION INTÉGRINES-FAK CHEZ LES CELLULES ÉPITHÉLIALES INTESTINALES	105
3.1 L'activation de Fak dépend de la signalisation intégrines-Fak	105
3.2 L'activation de Fak implique l'activité kinase des TKs Src distinctement selon l'état de différenciation des cellules épithéliales intestinales	106
3.3 L'activation des TKs Src est dépendante ou non de Fak et/ou de la signalisation intégrines-Fak distinctement selon l'état de différenciation ...	107
4. LES INTERACTIONS DIRECTES ENTRE LES TKS SRC ET FAK POURRAIENT AFFECTER L'ACTIVATION DE FAK ET DES TKS SRC ET AINSI EXPLIQUER LES MÉCANISMES COMPENSATOIRES D'ACTIVATION OBSERVÉS	111
V-CONCLUSIONS	116

REMERCIEMENTS.....	120
--------------------	-----

BIBLIOGRAPHIE.....	121
--------------------	-----

LISTE DES ILLUSTRATIONS ET DES TABLEAUX

I-INTRODUCTION

Figure 1.	Mécanismes de l'apoptose	3
Figure 2.	Voies de signalisation impliquées dans la survie et/ou la mort cellulaire ..	8
Figure 3.	Signalisation intégrines-Fak impliquée dans la survie.....	10
Figure 4.	La transmission de signaux par les intégrines.....	15
Figure 5.	Structure primaire et activation des TKs Src	19
Figure 6.	Implications des TKs Src médiées par leurs associations et leurs substrats dans les divers processus cellulaires	23
Figure 7.	L'axe crypte-villosité : unité morphologique et fonctionnelle de l'intestin grêle.....	29
Figure 8.	Mécanismes distincts de régulation de la survie et/ou de l'apoptose/anoï- kose selon l'état de différenciation des cellules épithéliales intestinales..	31
Figure 9.	Modèles cellulaires récapitulant l'axe crypte-villosité de l'intestin grêle humain.....	40

II-MATÉRIELS ET MÉTHODES

Tableau 1.	Inhibiteurs pharmacologiques utilisés.....	46
Tableau 2.	Anticorps primaires utilisés pour les analyses en Western blot.....	55

III-RÉSULTATS

Figure 10.	Expression de p60 ^{Src} au cours du processus de différenciation des cellules épithéliales intestinales humaines	60
Figure 11.	Expression de p59 ^{Fyn} au cours du processus de différenciation des cellules épithéliales intestinales humaines	61
Figure 12.	Expression de p62 ^{Yes} au cours du processus de différenciation des cellules épithéliales intestinales humaines	62
Figure 13.	Activation relative de p60 ^{Src} au cours du processus de différenciation des cellules épithéliales intestinales humaines.....	65
Figure 14.	Activation relative de p59 ^{Fyn} au cours du processus de différenciation des cellules épithéliales intestinales humaines.....	66
Figure 15.	Activation relative de p62 ^{Yes} au cours du processus de différenciation des cellules épithéliales intestinales humaines.....	67
Figure 16.	Inhibition de l'activité kinase des TKs Src par le PP2 induit l'apoptose chez les cellules épithéliales intestinales humaines	71
Figure 17.	Inhibition de l'activité kinase des TKs Src par l'herbimycine A induit l'apoptose chez les cellules épithéliales intestinales humaines	73
Figure 18.	Activation relative de p60 ^{Src} chez les cellules épithéliales intestinales lors de l'inhibition des TKs Src à l'aide d'inhibiteurs pharmacologiques.....	76
Figure 19.	Activation relative de p59 ^{Fyn} chez les cellules épithéliales intestinales lors de l'inhibition des TKs Src à l'aide d'inhibiteurs pharmacologiques.....	77
Figure 20.	Activation relative de p62 ^{Yes} chez les cellules épithéliales intestinales lors de l'inhibition des TKs Src à l'aide d'inhibiteurs pharmacologiques.....	78

Figure 21.	Activation relative de p60 ^{Src} chez les cellules épithéliales intestinales lors de l'inhibition de p125 ^{Fak} et de la signalisation intégrines-Fak	81
Figure 22.	Activation relative de p59 ^{Fyn} chez les cellules épithéliales intestinales lors de l'inhibition de p125 ^{Fak} et de la signalisation intégrines-Fak	82
Figure 23.	Activation relative de p62 ^{Yes} chez les cellules épithéliales intestinales lors de l'inhibition de p125 ^{Fak} et de la signalisation intégrines-Fak	83
Figure 24.	Activation relative de p125 ^{Fak} chez les cellules épithéliales intestinales lors de l'inhibition des TKs Src, de p125 ^{Fak} et de la signalisation intégrines-Fak	86
Figure 25.	Co-immunoprécipitation de p60 ^{Src} avec p125 ^{Fak} chez les cellules épithéliales intestinales lors de l'inhibition des TKs Src, de p125 ^{Fak} et de la signalisation intégrines-Fak	89
Figure 26.	Co-immunoprécipitation de p59 ^{Fyn} avec p125 ^{Fak} chez les cellules épithéliales intestinales lors de l'inhibition des TKs Src, de p125 ^{Fak} et de la signalisation intégrines-Fak	90
Figure 27.	Co-immunoprécipitation de p62 ^{Yes} avec p125 ^{Fak} chez les cellules épithéliales intestinales lors de l'inhibition des TKs Src, de p125 ^{Fak} et de la signalisation intégrines-Fak	91

IV-DISCUSSION

Figure 28.	Les mécanismes d'activation sont distincts pour les trois TKs Src et pour Fak selon l'état de différenciation et la lignée des cellules épithéliales intestinales.....	102
------------	--	-----

Figure 29.	Les interactions directes entre les TKs Src et Fak sont régulées distinctement selon l'état de différenciation et la lignée des cellules épithéliales intestinales	112
------------	--	-----

ABRÉVIATIONS ET SYMBOLES

Note : Comme dans la littérature en général, les acronymes anglophones sont utilisés pour éviter la confusion. Dans la liste d'abréviations, le nom est d'abord donné en français puis en anglais (entre parenthèse) dans le but de montrer la provenance de l'acronyme.

ADN	Acide déoxyribonucléique
AIF	Facteur inducteur d'apoptose (Apoptosis-inducing factor)
APAF-1	Facteur d'activation des protéases apoptotiques-1 (Apoptotic protease-activating factor-1)
Ask-1	Kinase régulant l'apoptose-1 (Apoptosis-regulating kinase-1)
ATP	Adénosine triphosphate
BSA	Albumine de sérum bovin (Bovine serum albumin)
°C	Degrés Celsius
Cas	Protéine associée à Crk (Crk-associated substrate)
Cav	Cavéoline
CD	Cytochalasine D
Csk	Kinase spécifique à la partie C-terminal de Src (C-terminal Src kinase)
Ctrl	Cellules contrôles non-traitées
DAPI	Dichlorure de 4',6-Diamino-2-phenylindole (4',6-Diamino-2-phenylindole dichloride)
DIABLO	Protéine avec un faible point isoélectrique liant directement les IAP (Direct IAP binding protein with low pI)
DISC	Complexe de signalisation inducteur de mort (Death-Inducing Signalling Complex)
DMEM	Milieu de Eagle modifié par Dulbecco (Dulbecco modified Eagle's medium)

DTT	Dithiothreitol
dUTP	Désoxyuridine triphosphate
ECL	(Enhanced chemiluminescence)
EDTA	Éthylène diamine tétra-acétate (Ethylene diaminetetraacetic acid)
EGF	Facteur de croissance épidermique (Epidermal growth factor)
ERK	Kinases régulées par des facteurs extracellulaires (Extracellular signal-regulated kinase)
Fak	Kinase d'adhésion focalisée (Focal adhesion kinase)
FBS	Sérum de bovins fœtaux (Fetal bovine serum)
FC	Facteur de croissance
FITC	Fluorescéine isothiocyanate
FRNK	(Fak-related non-kinase)
GEF	Facteur d'échange de nucléotides à guanine (Guanine exchange factor)
Gen	Génistéine
Graf	Régulateur de GTPase associé à Fak (GTPase regulator associated with focal adhesion kinase)
Grb	Protéine liée aux récepteurs de facteurs de croissance (Growth factor receptor-bound protein)
HA	Herbimycine A
Hsp-90	Protéine du choc thermique-90 (Heat shock protein-90)
HtrA2	Protéine A2 requérant une température élevée (High temperature requirement A2)
IAP	Protéine inhibitrice d'apoptose (Inhibitor of apoptosis protein)
IRS	Substrat du récepteur à l'insuline (Insulin receptor substrate)

ISEL	Marquage <i>in situ</i> des cassures d'ADN par le dUTP médié par la TdT (<i>In situ</i> terminal deoxynucleotidyltransferase-dUTP-mediated nick-end labelling)
JNK	Kinases du domaine NH2-terminal de c-Jun (c-Jun NH2-terminal kinases)
KCl	Chlorure de potassium
kDa	KiloDaltons
KH ₂ PO ₄	Phosphate de potassium monobasique
MAPK	Protéine kinase activée par les mytogènes (Mitogen-activated protein kinase)
MEK	MAPK/ERK kinase
MEKK	MAP kinase/ERK kinase kinase
Min	Minutes
MKK	MAP kinase kinase
ml	Millilitres
mM	Millimolaires
NaCl	Chlorure de sodium
Na ₂ HPO ₄	Phosphate de sodium dibasique
O/N	Pendant toute la nuit (Overnight)
PAGE	Électrophorèse sur gel de polyacrylamide (Polyacrylamide gel electrophoresis)
PBS	Tampon phosphate salin (Phosphate buffered saline)
PBS/T	PBS/Tween-20 0.05%
PC	Jours post-confluence
PDK	Kinase dépendante des lipides phosphatidylinositol (Phosphatidylinositol lipid-dependent kinase)
PI3-K	Phosphatidylinositol 3-kinase

PIP2	Phosphatidylinositol bisphosphate
PLC γ	Phospholipase C γ
PMSF	Fluorure de phenylmethysulfonyl (Phenylmethysulfonyl fluoride)
p-NPP	Para-nitrophényl phosphate
PolyHEMA	Poly-(2-hydroxyethyl methacrylate)
PP2	4-amino-5-(4-chlorophenyl)-7-(t-butyl)pyrazolo[3,4-d]pyrimidine
PtdINs	Phosphatinositides
ptyr	Tyrosine phosphorylée
pY	Tyrosine phosphorylée
RIPA	Tampon pour essais de radio-immunoprécipitation (Radioimmunoprecipitation assays buffer)
Rpm	Rotations par minute
RSK	Kinase ribosomale S6 (Ribosomal S6 kinase)
RTK	Récepteur à activité tyrosine kinase
SDS	Sulfate dodecyl de sodium (Sodium dodecyl sulfate)
SEM	Erreur standard sur la moyenne (Standard error on mean)
SH	Homologie à Src (Src homology)
Smac	Second activateur de caspases dérivé des mitochondries (Second mitochondria derived activator of caspase)
Stat	Transducteur de signal et activateur de transcription (Signal transducers and activator of transcription)
Susp.	Cellules maintenues en suspension
TCA	Acide trichloroacétique (Trichloroacetic acid)
TdT	Terminal désoxynucléotidyl transférase
TGF- α	Facteur de croissance transformant- α (Transforming growth factor- α)

TKs Src	Tyrosine kinases membres de la famille Src
T°P	Température pièce (i.e. 20 degrés Celsius)
TUNEL	Marquage des cassures d'ADN par le dUTP médié par la TdT (Terminal deoxynucleotidyltransferase-dUTP-mediated nick-end labeling)
Tyr	Tyrosine
U	Unité
µg	Microgramme
µl	Microlitre
µM	Micromolaire
Y	Tyrosine

Rôles et régulation des tyrosine kinases Src dans la survie entérocytaire humaine

Véronique Bouchard

Groupe IRSC Développement fonctionnel et physiopathologie du tractus digestif,
Dép. Anatomie et biologie cellulaire, Faculté de médecine et des sciences de la santé,
Université de Sherbrooke.

en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences (M. Sc.) en biologie cellulaire

Les mécanismes de régulation de la survie et/ou de l'apoptose/anoïkose sont connus pour être distincts selon l'état de différenciation des cellules épithéliales intestinales humaines. L'implication de la signalisation intégrines-Fak dans ces mécanismes diffère elle aussi le long de l'axe crypte-villosité. Les tyrosine kinases membres de la famille Src (TKs Src) sont reconnues pour leur participation dans la signalisation intégrines-Fak chez plusieurs types cellulaires. De plus, certaines de leurs diverses implications dans la transduction de signaux émanant de cette signalisation peuvent diverger entre chaque TKs Src.

Jusqu'à ce jour, les différences entre chacune des TKs Src ont été très peu étudiées, notamment celles potentiellement retrouvées dans les mécanismes de régulation de la survie des cellules épithéliales intestinales selon l'état de différenciation de ces dernières. L'hypothèse de travail de mon sujet de recherche est que Src, Fyn et Yes sont exprimées, activées et régulées distinctement selon l'état de différenciation des cellules épithéliales intestinales, notamment dans les mécanismes de régulation de la survie et/ou de l'apoptose/anoïkose impliquant la signalisation intégrines-Fak. Les objectifs spécifiques de mon projet de recherche étaient les suivants: 1) Analyser la contribution de Src, Fyn et Yes dans la survie selon l'état de différenciation des cellules épithéliales intestinales; 2) Analyser, selon l'état de différenciation des cellules épithéliales intestinales, l'implication de Src, Fyn et Yes, via leurs activation et activité, dans la signalisation intégrines-Fak des mécanismes de régulation de la survie; 3) Analyser les associations directes de Src, Fyn et Yes avec Fak selon l'état de différenciation des cellules épithéliales intestinales.

Dans un premier temps, nous avons montré que les profils d'expression et d'activation des TKs Src étaient distincts selon la kinase, l'état de différenciation et la lignée cellulaire, laissant entrevoir des rôles propres à chacune des TKs Src. Par l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques, nous avons montré que l'activité tyrosine kinase des TKs Src protégeait de l'apoptose à tous les stades de différenciation, mais que la susceptibilité à entrer en apoptose changeait selon l'état de différenciation lors de l'inhibition de cette activité. De plus, il y avait des impacts sur les niveaux d'activation des TKs Src variables selon la kinase, l'état de différenciation, la lignée et l'inhibiteur utilisé. Ceci suggère des implications différentes pour chacune des TKs Src selon l'état de différenciation dans les mécanismes de régulation de la survie. Toutefois, nous n'avons pu déterminer quelle(s) TK(s) Src étai(en)t importante(s) à chaque stade de différenciation. Nous avons aussi montré que les HIEC étaient différentes des Caco-2/15 indifférenciées.

Dans un second temps, nous avons montré que l'activation des TKs Src pouvait être dépendante ou indépendante de Fak et/ou de la signalisation intégrines-Fak et ce, selon la kinase et l'état de différenciation. L'activation de Fak par les TKs Src variait aussi selon l'état de différenciation, car seules les cellules différenciées semblaient pouvoir activer Fak directement. Il y a donc des différences entre les TKs Src dans les cassettes de signalisation de Fak selon l'état de différenciation. Celles-ci sont d'ailleurs un début de compréhension de l'implication potentiellement distincte de chacune des TKs Src dans les mécanismes de régulation de la survie et/ou de l'apoptose des cellules épithéliales intestinales.

Dans un troisième temps, nous avons montré qu'il y avait des interactions directes entre les TKs Src et Fak, mais que la régulation de celles-ci était propre à la kinase, l'état de différenciation et la lignée cellulaire. De plus, ces associations nous ont permis potentiellement d'expliquer certains mécanismes d'activation compensatoires retrouvés tout au cours de cette étude. Ces mécanismes d'activation compensatoires pourraient fournir des explications concernant les mécanismes de régulation de la survie et/ou de l'apoptose.

En résumé, notre étude a permis de montrer qu'il existait des variations quant à l'expression, l'activation et la régulation entre chacune des TKs Src étudiées selon l'état de différenciation des cellules épithéliales intestinales, notamment dans les mécanismes de régulation de la survie et/ou de l'apoptose/anoïkose impliquant la signalisation intégrines-Fak. Ces résultats dans leur ensemble suggèrent que les TKs Src exerceraient des rôles distincts dans la suppression de l'anoïkose selon l'état de différenciation des cellules épithéliales intestinales. Toutefois, cette étude n'est qu'un début d'explication puisqu'il reste encore beaucoup à faire avant de définir précisément l'implication de chacune des TKs Src dans les mécanismes de régulation de la survie et/ou de l'apoptose/anoïkose des cellules épithéliales intestinales.

I – INTRODUCTION

1. Apoptose

1.1 Caractéristiques générales et morphologiques de l'apoptose

L'apoptose est une forme de mort cellulaire qui permet l'élimination de cellules endommagées, surnuméraires ou potentiellement dangereuses pour l'organisme. Par conséquent, l'apoptose est un processus essentiel au développement et à l'homéostasie tissulaire (White, 1996; Jacobson et al., 1997; Philchenkov, 2004). Au niveau morphologique de la cellule, l'apoptose est caractérisée par un rétrécissement cellulaire, une vacuolisation membranaire, une condensation de la chromatine, une endonucléolyse de l'ADN génomique (principalement les séquences internucléosomiques), un désassemblage d'organelles cellulaires, une fragmentation nucléaire, une protéolyse totale et une cytolysse non-inflammatoire (Reed, 1994; White, 1996; Adams et Cory, 1998; Saini et Walker, 1998; Valentijn et al., 2004). Ceci mènera à la formation d'un corpuscule apoptotique renfermant le contenu cellulaire réduit à sa plus simple expression. La membrane plasmique subit des modifications qui permettront la reconnaissance de la cellule apoptotique par les macrophages et/ou par les cellules avoisinantes. Il y aura alors élimination du corpuscule apoptotique par phagocytose (Albert et al., 2002). Les corpuscules apoptotiques peuvent aussi être exfoliés dans une lumière (Kroemer et al., 1995; Vaux et Strasser, 1996; Hale et al., 1996; Albert et al., 2002). L'apoptose n'est pas dommageable pour les cellules avoisinantes, contrairement à

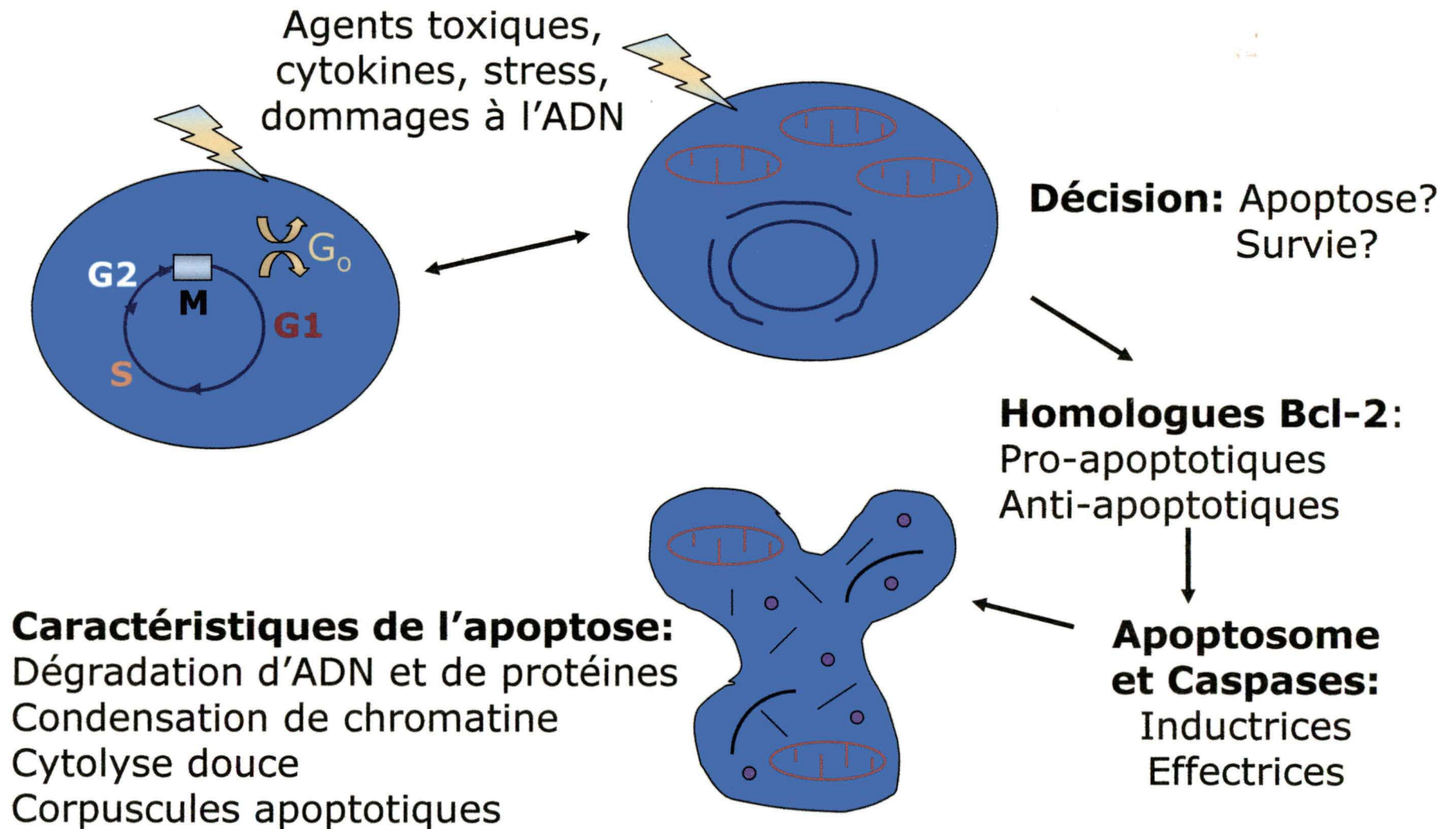
la nécrose, une autre forme de mort cellulaire, qui enclenche une réponse inflammatoire (Philchenkov, 2004). Il y aura même recyclage des composants réduits à leur plus simple expression dans les cellules ayant phagocyté les corpuscules apoptotiques (Kroemer et al., 1995; Albert et al., 2002) (Figure 1).

1.2 Phases décisionnelle et effectrice de l'apoptose : les principaux acteurs

L'apoptose est régie par un programme génétiquement conservé autant chez les invertébrés que chez les vertébrés (Ellis et al., 1991; Igaki et Muria, 2004). L'apoptose est intrinsèque à chaque cellule et peut être induite suite à certains stimuli, tels les agents génotoxiques (oxydants, irradiations), les dommages à l'ADN, les toxines, les infections virales, ainsi que les chocs thermiques ou osmotiques (Sainsi et Walker, 1998; Philchenkov, 2004; Rapp et al., 2004). La survie cellulaire n'est cependant pas un processus passif puisque la cellule a constamment besoin de signaux de survie pour empêcher son entrée en apoptose. Les hormones, certaines cytokines, les facteurs de croissance ainsi que la matrice extracellulaire sont quelques exemples de signaux de survie (Wu et al., 1995; Wallen et al., 1991; Xia et al., 1995; Meredith et al., 1993; Ruoslahti et Reed, 1994; Frish et Francis, 1994; Boudreau et al., 1995; Rapp et al., 2004). L'intégration par la cellule des signaux anti- et pro-apoptotiques provenant de son environnement extérieur et/ou intérieur influence la destinée de la cellule. À tout moment, la cellule est sujette à être induite à entrer en apoptose (Figure 1).

Figure 1. Mécanismes de l'apoptose. Certains stimuli peuvent induire la cellule à entrer en apoptose (ex : stress, agents toxiques). Toutefois, la survie cellulaire dépend constamment des signaux anti- et pro-apoptotiques qui affluent à la cellule. L'intégration de ces signaux se fait principalement par les homologues Bcl-2 (pro- et anti-apoptotiques). Lorsqu'il y a décision d'entrer en apoptose, i.e. lorsque la balance favorise les homologues Bcl-2 pro-apoptotiques, il y a alors formation de l'apoptosome et activation des caspases (inductrices et effectrices). L'activité protéolytique des caspases est responsable du démantèlement cellulaire caractéristique de l'apoptose menant à la formation du corpuscule apoptotique.

Apoptose



1.2.1 Les homologues Bcl-2

L'intégration des signaux anti- et pro-apoptotiques se fait principalement par la famille de protéines des homologues Bcl-2. Ceux-ci jouent un rôle central dans la détermination du devenir de la cellule puisqu'ils sont responsables de la phase décisionnelle de l'apoptose (Adam et Cory, 1998; Reed et al., 1996; Philchenkov, 2004). Jusqu'à présent, au moins vingt membres ont été identifiés chez les mammifères (Cory et Adams, 2002). Les homologues Bcl-2 comptent parmi eux des membres anti-apoptotiques (ex : Bcl-2, Bcl-X_L et Mcl-1) et des membres pro-apoptotiques (ex : Bax, Bak et Bad). Les interactions protéine-protéine sont centrales dans la régulation des fonctions des homologues Bcl-2. Les différentes homo- et hétérodimérisations entre homologues Bcl-2 mènent au titrage de certains membres et, par conséquent, de leur fonction pro- ou anti-apoptotique (Adams et Cory, 2002; Valentijn et al., 2004). Lorsque la cellule reçoit des signaux, la balance entre l'activité de tous les homologues Bcl-2 anti-apoptotiques versus l'activité de tous les homologues Bcl-2 pro-apoptotiques est affectée. Selon la classe des homologues majoritairement actifs, il y a décision d'enclencher ou non le processus apoptotique (Philchenkov, 2004) (Figure 1).

1.2.2 Les caspases

Lorsque le processus apoptotique est enclenché, il y a activation de caspases. Les caspases sont une famille de cystéine protéases de haute spécificité. Jusqu'à ce jour, au moins 15 membres ont été identifiés chez les mammifères, dont 12 chez l'humain

(Thornberry et al., 1997; Philchenkov, 2004). Les caspases sont synthétisées sous la forme de pro-caspases inactives (zymogènes). Il y a dimérisation des pro-caspases inductrices au sein de complexes protéiques comme par exemple l'apoptosome (voir Section 1.2.3) ou le complexe de signalisation inducteur de mort («Death-Inducing Signalling Complex») (DISC). Ceci permet l'activation des caspases par autoclivage intermoléculaire (Philchenkov, 2004). Les caspases inductrices (ex : caspases 8 et 9) peuvent ensuite cliver et activer les caspases effectrices (ex : caspases 3 et 7) (Stennicke et al., 1998; Cory et Adams, 2002; Philchenkov, 2004). Les caspases sont responsables du démantèlement cellulaire caractéristique de l'apoptose (Li et al., 1997, Stennicke et al., 1998; Degli Esposti, 2004). Par clivage protéolytique, elles inhibent plusieurs protéines impliquées dans la signalisation de la survie (Philchenkov, 2004; Grossmann, 2002), comme Fak et Akt (Widmann et al., 1998; Wen et al., 1997; Bachelder et al., 1999; Rokudai et al., 2000) et certains homologues Bcl-2 anti-apoptotiques, comme Bcl-2 et Bcl-X_L (Cheng et al., 1997; Clem et al., 1998). Ceci constitue la phase effectrice de l'apoptose.

1.2.3 L'apoptosome et le contrôle de la phase décisionnelle par les homologues Bcl-2

Le contrôle de l'entrée en apoptose par les homologues Bcl-2 réside principalement dans la régulation de l'assemblage d'un complexe cytoplasmique appelé apoptosome (Philchenkov, 2004). L'apoptosome est composé du facteur d'activation des protéases apoptotiques-1 (APAF-1), de cytochrome *c* et d'un dimère de pro-caspases inductrices (comme la pro-caspase-9), ceci en présence d'ATP (Zou et al., 1999; Valentijn et al.,

2004). La modulation de l'assemblage de l'apoptosome est régie principalement par l'implication des homologues Bcl-2 dans l'intégrité de la membrane externe de la mitochondrie. Lors d'apoptose, les homologues Bcl-2 affectent la perméabilité de cette membrane par la formation de pores et permettent ainsi la libération du cytochrome *c*, qui se trouve normalement dans l'espace intermembranaire de la mitochondrie (Muchmore et al., 1996; Vander Heiden et al., 1997; Degli Esposti, 2004; Philchenkov, 2004). De plus, les pores formés par les homologues Bcl-2 permettent aussi la relâche de Smac/DIABLO et Omi/HtrA2, qui sont des protéines qui inhibent l'effet des protéines inhibitrices d'apoptose (IAP). Elles empêchent alors les IAP de lier et ainsi d'inhiber les caspases (Philchenkov, 2004; Cory et Adams, 2002). De plus, il y aura la libération d'endonucléase G et du facteur inducteur d'apoptose («apoptosis-inducing factor») (AIF), qui sont impliqués dans la dégradation d'ADN et dans la condensation de la chromatine (Philchenkov, 2004; Cory et Adams, 2002).

2. Les voies de signalisation impliquées dans la survie cellulaire et/ou dans l'apoptose

Les signaux extracellulaires, par exemple les facteurs de croissance et l'adhésion cellulaire, sont impliqués dans la survie cellulaire puisqu'ils activent des voies de signalisation (Anderson, 1997; Giancotti et Ruoslahti, 1999; Datta et al., 1999; Cross et al., 2000; Whitehead et al., 2000) (Figure 2 ; Figure 3). Parmi les voies de signalisation impliquées dans la survie, il y a la voie des protéines kinases activées par des mytogènes (MAPK) $p42^{Erk-2}/p44^{Erk-1}$, aussi appelée la voie MEK/Erk, et celle de la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K)/ $p57^{Akt}$ (Anderson, 1997; Datta et al., 1999,

Giancotti et Ruoslahti, 1999; Cross et al., 2000). D'autres voies activées peuvent en plus mener à la mort cellulaire. Les voies des MAP kinases de stress (SAPK), soit les c-Jun NH2-terminal kinases (JNKs) et les p38, en sont des exemples (Giancotti et Ruoslahti, 1997; Frish et Screaton, 2001; Kyriakis et Avruch, 2001). L'implication de toutes ces voies de signalisation dans la survie varie selon le type cellulaire, selon l'état de différenciation et selon les stimuli reçus, augmentant ainsi la complexité et la spécificité de la régulation de l'apoptose (Anderson, 1997; Datta et al., 1999; Coppolino et Dedhar, 2000; Gauthier et al., 2001; Vachon et al., 2002; Dufour et al., 2004) (Figure 2 ; Figure 3).

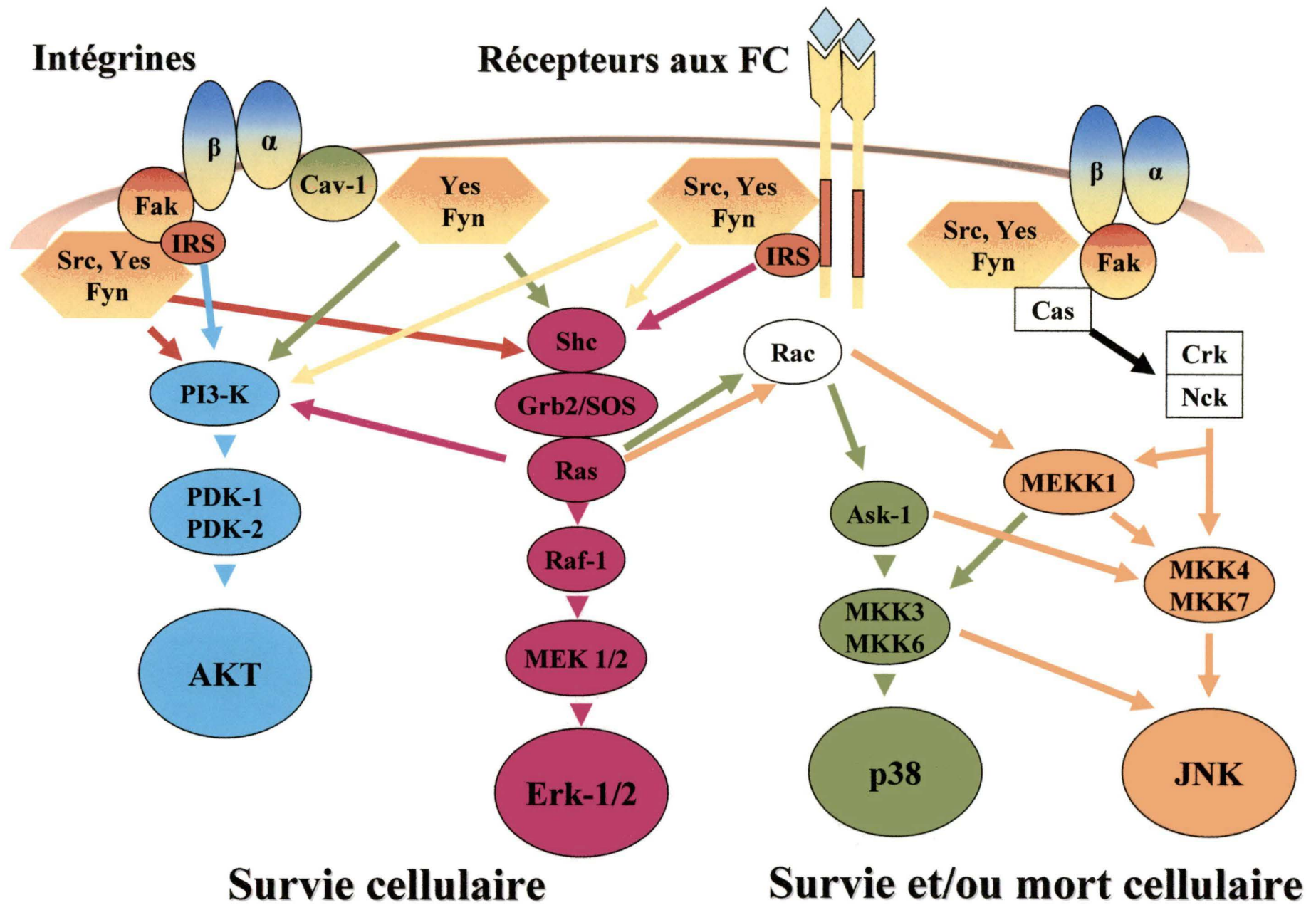
2.1 La voie de la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K)

La PI3-K est composée de deux sous-unités : la sous-unité régulatrice p85 et la sous-unité catalytique p110 (Katso et al., 2001). L'activité de la PI3-K est induite par plusieurs stimuli tels que les récepteurs de facteurs de croissance possédant une activité tyrosine kinase intrinsèque (Katso et al., 2001) et également via les intégrines (Clark et Brugge, 1995). Il y a d'abord recrutement de la p85, suivi d'un changement de conformation permettant la liaison de la sous-unité catalytique, la p110. La PI3-K est alors pleinement active et pourra phosphoryler en position 3 les phosphatinositides (PtdIns) produisant alors le PtdIns(3,4)P₂ et le PtdIns(3,4,5)P₃. Il a été démontré que l'activité PI3-kinase était requise pour la survie d'une grande variété de types cellulaires (Wymann et Pirola, 1998; Datta et al., 1999; Chan et al., 1999; Vanhaesebroeck et Alessi, 2000; Harnois et al., 2004).

Figure 2. Voies de signalisation impliquées dans la survie et/ou la mort cellulaire.

Lorsque les récepteurs aux facteurs de croissance et/ou les intégrines sont activés, il y a alors activation de voies de signalisation impliquées dans la survie et/ou la mort cellulaire. Parmi les voies de signalisation impliquées dans la survie, il y a les voies des MEK/Erk et celle de la PI3-K/Akt. D'autres voies activées peuvent mener soit à la survie cellulaire ou à la mort cellulaire. Les voies des MAP kinases de stress (SAPK), soit les JNK et les p38, en sont des exemples. L'implication de toutes ces voies de signalisation dans la survie varie selon le type cellulaire, l'état de différenciation et les stimuli reçus, augmentant ainsi la complexité et la spécificité de la régulation de l'apoptose. Notons ici la présence des TKs Src en amont dans l'activation de ces voies de signalisation.

Abréviations : α = sous-unité α ; β = sous-unité β ; Akt = kinase Akt; Ask-1 = kinase régulant l'apoptose-1; Cas = protéine associée à Crk; Cav-1 = cavéoline-1; Crk = protéine adaptatrice Crk; ERK-1/2 = kinase régulée par des facteurs extracellulaires-1/2 ; Fak = kinase d'adhésion focalisée; FC = facteur de croissance; Fyn = tyrosine kinase Fyn; Grb2 = protéine liée aux récepteurs de facteurs de croissance 2; IRS = substrat du récepteur à l'insuline; JNK = kinase du domaine NH₂-terminal de c-Jun; MEK1/2 = MAPK/ERK kinase 1/2 ; MEKK1 = MAP kinase/ERK kinase kinase 1; MKK3, 4, 6, 7 = MAP kinase kinase 3, 4, 6, 7; Nck = protéine adaptatrice Nck; PDK-1, -2 = kinase dépendante des lipides phosphatidylinositol-1, -2; PI3-K = phosphatidylinositol 3-kinase; p38 = MAP kinase de stress p38; Rac = GTPase Rac; Raf-1 = kinase Raf-1; Ras = GTPase Ras; Shc = protéine adaptatrice Shc; Sos = protéine Sos; Src = tyrosine kinase Src; Yes = tyrosine kinase Yes.



2.1.1 Akt : principal effecteur de la PI3-K dans la promotion de la survie

Akt, une sérine-thréonine kinase qui est l'effecteur principal de la PI3-K, augmente la résistance à l'apoptose des cellules. L'effet protecteur d'Akt s'explique par la suppression de nombreuses composantes directement impliquées dans la machinerie apoptotique (Figure 3). En effet, Akt peut phosphoryler la protéine pro-apoptotique Bad sur les sérines 112 et 136 (Datta et al., 1997; Del Peso et al., 1997; Blume-Jensen et al., 1998). Ces phosphorylations contribuent au recrutement de Bad par la protéine 14-3-3 amenant ainsi Bad dans une voie de dégradation (Muslin et al., 1996; Yaffe et al., 1997). Akt phosphoryle la pro-caspase 9, empêchant ainsi son activation (Cardone et al., 1998). Akt phosphoryle également des facteurs de transcription de la famille « Forkhead », les empêchant d'atteindre leurs cibles transcriptionnelles, telles que Fas et TNF α (« Tumor necrosis factor α ») (Brunet et al., 1999; Kops et al., 1999; Biggs et al., 1999).

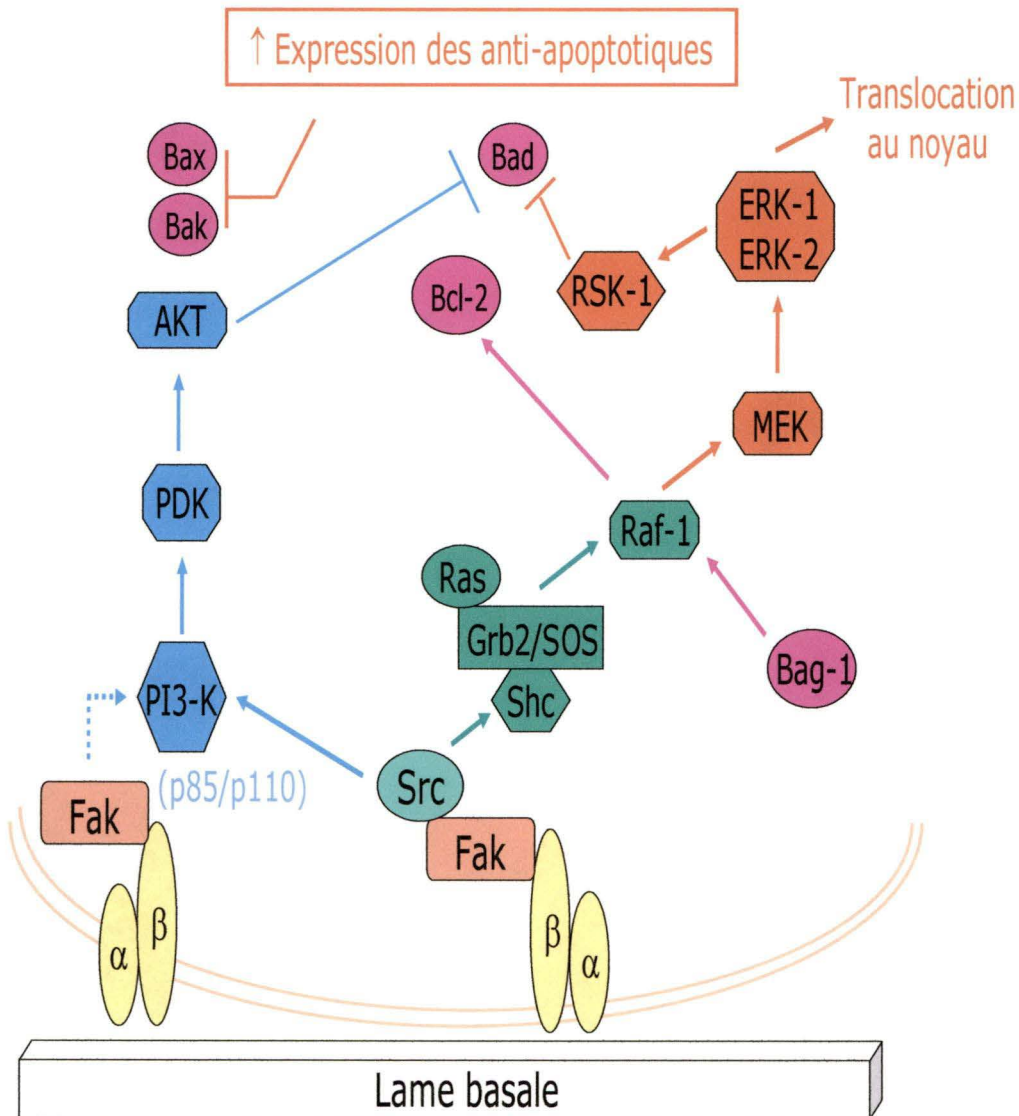
2.2 La voie des MEK/Erk

Plusieurs stimuli mènent à l'activation de la voie des MEK/Erk dont les facteurs de croissance, via leur récepteur (Albert et al., 2002), ainsi que les composantes de la matrice extracellulaire, via les intégrines (Clark et Brugge, 1995). Outre son implication dans la prolifération cellulaire, la voie des MEK/Erk pourrait contribuer à l'inhibition de l'apoptose chez certains types cellulaires (Figure 2 ; Figure 3). Des études suggèrent que l'activation de p42^{Erk-2}/p44^{Erk-1} protège contre des stimuli pro-apoptotiques tels que l'activation de récepteur Fas (Holmstrom et al., 1998; Yeh et al., 1998), l'absence de

Figure 3. *Signalisation intégrines-Fak impliquée dans la survie.* Par l'activation des voies des MEK/Erk-1/2 et celle de la PI3-K, la signalisation intégrines-Fak promeut la survie de plusieurs façons. Tout d'abord, il y a augmentation de l'expression des homologues Bcl-2 anti-apoptotiques, diminuant ainsi l'action des homologues pro-apoptotiques. Dans la voie de la PI3-K, Akt peut phosphoryler Bad et ainsi l'inactiver en l'envoyant vers la voie de dégradation du protéasome. Rsk effectue le même rôle lors de l'activation des Erk-1/2. De plus, les fonctions de l'homologue anti-apoptotique Bcl-2 sont augmentées puisque Raf-1, un activateur en amont des Erk, le phosphoryle à la membrane mitochondriale. Ceci s'effectue lors du recrutement de Raf-1 par la protéine anti-apoptotique Bag-1.

Abréviations : α = sous-unité α ; β = sous-unité β ; Akt = kinase Akt; Bad = homologue Bad; Bag-1 = protéine anti-apoptotique Bag-1; Bak = homologue Bak; Bax = homologue Bax; Bcl-2 = homologue Bcl-2; ERK-1, ERK-2 = kinase régulée par des facteurs extracellulaires-1, -2 ; Fak = kinase d'adhésion focalisée; Grb2 = protéine liée aux récepteurs de facteurs de croissance 2; MEK = MAPK/ERK kinase; PDK = kinase dépendante des lipides phosphatidylinositol; PI3-K = phosphatidylinositol 3-kinase; Raf-1 = kinase Raf-1; Ras = GTPase Ras; RSK-1 = kinase ribosomale S6; Shc = protéine adaptatrice Shc; Sos = protéine Sos; Src = tyrosine kinase Src.

Signalisation dans la survie cellulaire



sérum (Gardner et Johnson, 1996; Kinoshita et al., 1997) et la perturbation de l'adhésion cellulaire (anoïkose) (Le Gall et al., 2000).

Jusqu'à ce jour, certains substrats des $p42^{Erk-2}/p44^{Erk-1}$ impliqués dans la survie ont été identifiés (Figure 3). Ainsi, $p90^{RSK}$, une kinase en aval de $p42^{Erk-2}/p44^{Erk-1}$, est capable de phosphoryler l'homologue Bcl-2 pro-apoptotique Bad sur des résidus sérine (ser-112 et ser-155) (Tan et al., 1999; Tan et al., 2000). La phosphorylation sur la sérine 155 de Bad empêche son hétérodimérisation avec l'homologue Bcl-2 anti-apoptotique Bcl-X_L (Tan et al., 2000; Datta et al., 2000; Lizcano et al., 2000; Zhou et al., 2000). De plus, la phosphorylation sur la sérine 112 permet la séquestration et l'inactivation de Bad par la protéine 14-3-3 (Tan et al., 1999).

Il y a aussi des joueurs en amont des $p42^{Erk-2}/p44^{Erk-1}$. Bien que la kinase Raf-1 soit un activateur en amont des $p42^{Erk-2}/p44^{Erk-1}$, celle-ci est impliquée dans la suppression de l'apoptose. En effet, la protéine anti-apoptotique Bag-1 amène Raf-1 à la membrane mitochondriale. Ceci permet à Raf-1 de phosphoryler la protéine Bcl-2, augmentant ainsi les fonctions anti-apoptotiques de Bcl-2 (Wang et al., 1996; Wang et al., 1999). Il a également été démontré que Raf-1 était capable de phosphoryler l'homologue Bcl-2 pro-apoptotique Bad sur résidus sérine pour l'inhiber (Zha et al., 1996; Rapp et al., 2004).

2.3 Les MAPK de stress (SAPK) : p38 et JNK

Les JNK et les p38 répondent principalement à divers stress cellulaires. Par exemple, ces voies sont activées en réponse à l'hyperosmolarité, à certaines cytokines inflammatoires et à l'irradiation d'ultraviolets (Han et al., 1994; Hazzalin et al., 1996; Kyriakis et al., 2001). Contrairement aux deux autres voies vues précédemment, les voies des p38 et des JNK sont plutôt impliquées dans l'induction de l'apoptose et de l'anoïkose (Figure 2). En effet lorsqu'il y a induction d'apoptose, ces deux voies entraînent notamment une augmentation d'expression des homologues pro-apoptotiques et une diminution d'expression des homologues anti-apoptotiques (Kyriakis et al., 2001). Toutefois, l'implication de ces voies dépend du stimulus extérieur, du type cellulaire et des isoformes impliquées (Vachon et al., 2002; Wang et al., 1998).

3. Les intégrines et leurs implications dans la régulation de la survie cellulaire et/ou de l'anoïkose

3.1 Anoïkose

Pour survivre, une cellule doit adhérer à sa matrice extracellulaire via les intégrines (voir Section 3.2). En effet, s'il y a des perturbations dans l'adhésion cellulaire causant la perte du lien cellule-matrice, ceci induit une forme d'apoptose chez divers types cellulaires (Meredith et al., 1993 ; Frisch et Francis, 1994). Ce type particulier d'apoptose porte le nom d'anoïkose (mot grecque signifiant sans abri) (Frisch et Francis, 1994).

L'anoïkose est nécessaire au cours du développement et pour l'homéostasie des tissus (Grossmann, 2002). S'il y a des dérèglements dans le processus d'anoïkose, ceci mène souvent à des désordres pathologiques, comme le cancer (Ruoslathi et Reed, 1994; Cory et Adams, 2002). La signalisation par les intégrines (voir Section 3.3) joue un rôle clé dans le maintien de la survie médiée par l'adhésion cellulaire ainsi que dans l'induction d'anoïkose lorsqu'il y a perturbation de l'adhésion cellulaire (Giancotti et Ruoslahti, 1999; Gauthier et al., 2001). Cette signalisation affecte l'expression et les fonctions des homologues Bcl-2 ainsi que l'état d'activation des caspases (Giancotti et Ruoslahti, 1999; Grossmann, 2002).

3.2 Les intégrines

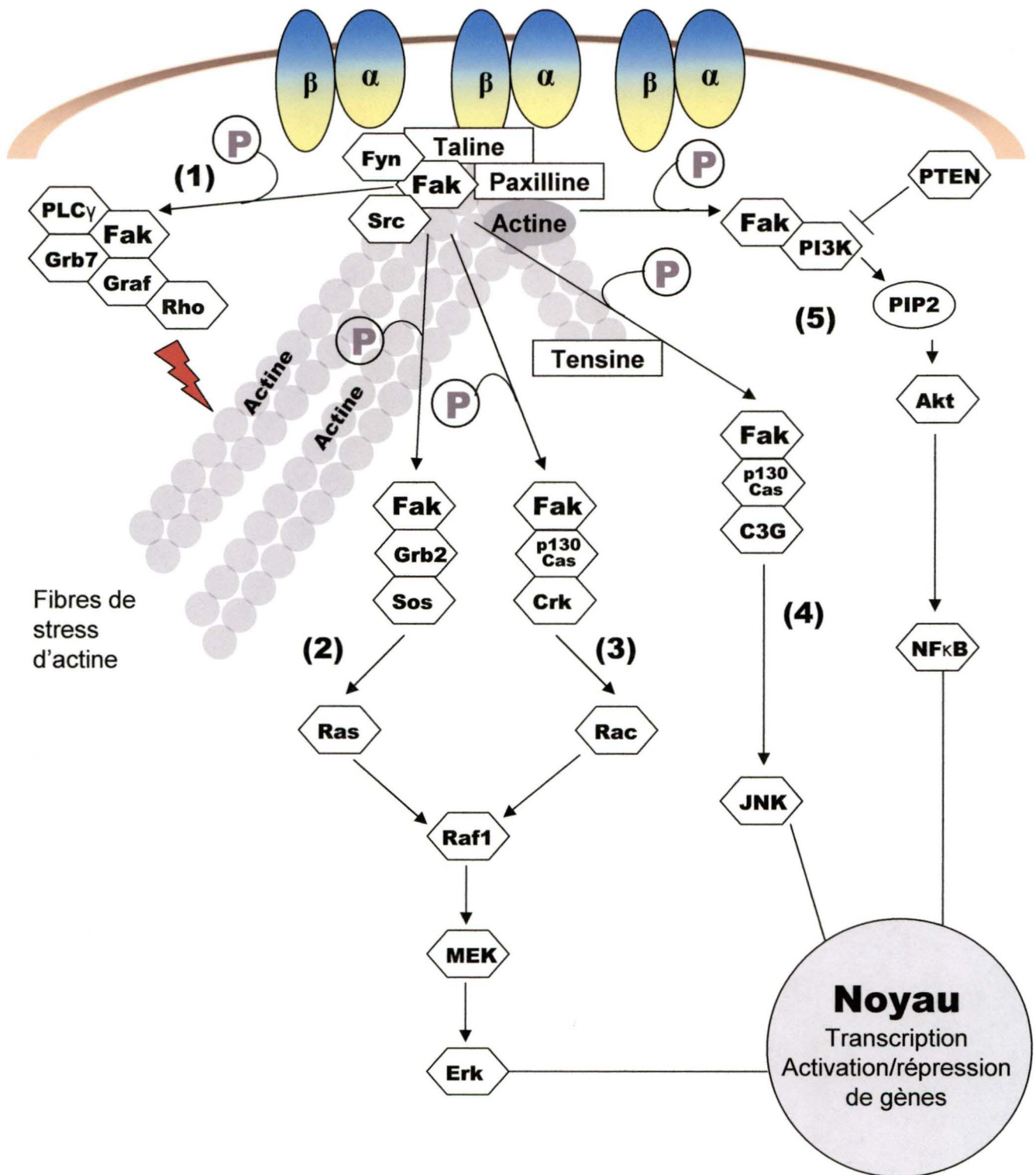
Les intégrines constituent une famille de récepteurs transmembranaires hétérodimériques composés d'une sous-unité α liée de façon non-covalente à une sous-unité β (Hynes, 1992; Giancotti et Ruoslahti, 1999). Dix-huit sous-unités α et huit sous-unités β , capables de former vingt-deux récepteurs différents, ont été caractérisées à ce jour (Playford et Schaller, 2004). Les intégrines sont reconnues comme étant les récepteurs principaux des protéines de la matrice extracellulaire interagissant avec les protéines du cytosquelette (Hynes, 1992; Valentijn et al., 2004). Toutefois, chaque hétérodimère possède des propriétés de liaison et de signalisation qui lui est propre (Giancotti et Ruoslahti, 1999).

3.3 La transmission de signaux par les intégrines

Le domaine cytoplasmique des intégrines est généralement court et dépourvu d'activité enzymatique (Hynes, 1992; Giancotti et Ruoslahti, 1999). Les intégrines transmettent leurs signaux via leurs interactions avec des protéines du cytosquelette et des kinases cytoplasmiques (Figure 4). Suite à un signal, par exemple la liaison d'un ligand de la matrice extracellulaire, les intégrines se regroupent en des points de contact appelés plaques d'adhésion focalisées (Burridge et Chrzanowska-Wodnicka, 1996). Ce regroupement d'intégrines cause des réorganisations du cytosquelette ainsi que l'activation de cascades de signalisation intracellulaires (Giancotti et Ruoslahti, 1999). En effet, l'association des intégrines avec des protéines du cytosquelette et des kinases permet la formation de fibres de stress. De plus, les plaques d'adhésion focalisées servent de carrefours à la signalisation par les intégrines puisqu'elles concentrent certaines kinases qui activent plusieurs voies de signalisation (Burridge et Chrzanowska-Wodnicka, 1996 ; Giancotti et Ruoslahti, 1999; Valentijn et al., 2004). Ces voies, comme par exemple les voies de la PI3-K et MEK/Erk (voir Sections 2.1 et 2.2), mèneront à l'activation/répression de gènes impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire, de la différenciation, de la migration et de la survie (Giancotti et Ruoslahti, 1999) (Figure 2; Figure 3; Figure 4).

Figure 4. *La transmission de signaux par les intégrines.* Schéma simplifié des possibilités d'interactions entre les protéines et les voies de signalisation activées au sein des plaques d'adhésion focalisées. Fak est initialement activée par l'intermédiaire des intégrines. Son activation permet la liaison de plusieurs protéines participant au remaniement du cytosquelette (1). De plus, l'interaction de Fak avec p130Cas, Grb2 ou PI3-K peut activer plusieurs voies de signalisation intracellulaires comme la voie des MEK/Erk (2 et 3), des JNK (4) et la voie de la PI3-K/Akt (5). Ces voies sont impliquées dans la régulation de plusieurs processus cellulaires tels que la survie, la prolifération et la migration cellulaire. Ceci favorise l'activation de facteurs de transcription menant à l'activation ou la répression de divers gènes. (Schéma adapté de Cornillon et al., 2003).

Abréviations : α = sous-unité α ; β = sous-unité β ; Akt = kinase Akt; Crk = protéine adaptatrice Crk; C3G = facteur d'échange de nucléotides à guanine (GEF) C3G; ERK = kinase régulée par des facteurs extracellulaires; Fak = kinase d'adhésion focalisée; Fyn = tyrosine kinase Fyn; Graf = régulateur de GTPase associé à Fak; Grb2, 7 = protéine liée aux récepteurs de facteurs de croissance 2, 7; JNK = kinase du domaine NH₂-terminal de c-Jun; MEK = MAPK/ERK kinase; NF κ B = facteur de transcription NF κ B; P = phosphorylation; PIP₂ = phosphatidylinositol bisphosphate; PI3-K = phosphatidylinositol 3-kinase; PLC γ = phospholipase C γ ; PTEN = phosphatase PTEN; p130Cas = protéine associée à Crk; Rac = GTPase Rac; Raf-1 = kinase Raf-1; Ras = GTPase Ras; Rho = protéines Rho; Sos = protéine Sos; Src = tyrosine kinase Src.



3.3.1 La signalisation intégrines-Fak

La kinase d'adhésion focalisée («Focal adhesion kinase») (Fak) est un effecteur de la signalisation par les intégrines (Figure 4). Le recrutement et l'activation de la tyrosine kinase Fak est un événement précoce qui survient suite au regroupement («clustering») des intégrines (Giancotti et Ruoslahti, 1999). Fak est directement recrutée par le domaine cytoplasmique de la sous-unité β des intégrines ou indirectement via des protéines du cytosquelette telles que la taline et la paxilline (Cornillon et al., 2003; Kumar, 1998; Schaefer et Hunter, 1998). Il y a alors autophosphorylation de Fak sur la tyrosine en position 397. Cette autophosphorylation crée un site de liaison pour le domaine SH2 de certaines kinases comme les tyrosine kinases membres de la famille Src (TKs Src) (Schaller et al., 1994 ; Schaefer et al., 1994) (les TKs Src sont présentées à la Section 4). Les TKs Src phosphorylent alors des composantes des plaques d'adhésion focalisées et des protéines impliquées dans la signalisation intracellulaire (Richardson et Parson, 1996 ; Vuori et al., 1996 ; Schaefer et al., 1997). Fak peut également activer la PI3-K de façon Src dépendante ou indépendante (Chen et al., 1996). La phosphorylation de la tyrosine en position 925 de Fak par les TKs Src crée un site d'interaction pour le complexe Grb-2/mSOS, menant ainsi à l'activation de la voie Ras/Raf-1/MEK/Erk (Schaefer et al., 1994).

La signalisation intégrines-Fak serait importante pour la survie cellulaire et la suppression de l'anoïkose. En effet, l'inhibition de Fak augmente l'incidence d'anoïkose chez plusieurs types cellulaires (McLean et al., 2004; Xu et al., 1996; Hungerford et al.,

1996). *In vivo* chez les souris, il a été démontré que la délétion spécifique de Fak, effectuée avec la technologie de *Cre/loxP*, supprimerait la formation de cancers et qu'elle en bloquerait aussi la progression. (McLean et al., 2004). La délétion de Fak entraîne une augmentation d'apoptose qui se traduit par une augmentation de caspase-3 active (McLean et al., 2004). À l'opposé, l'utilisation d'un mutant de Fak constitutivement actif protégerait les cellules épithéliales de l'anoïkose (Frisch et al., 1996). Fak semble donc jouer un rôle majeur dans la transmission des signaux de survie émis par les intégrines (Frisch et al., 1996 ; Ilic et al., 1998).

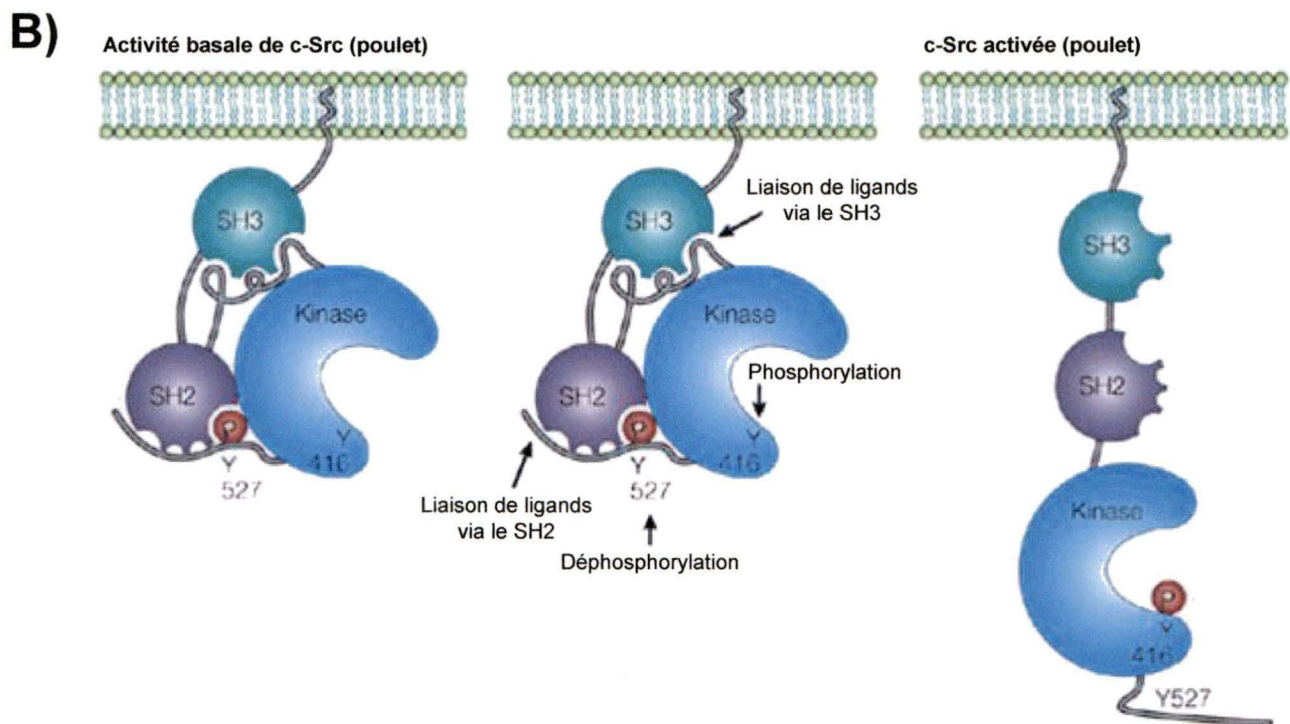
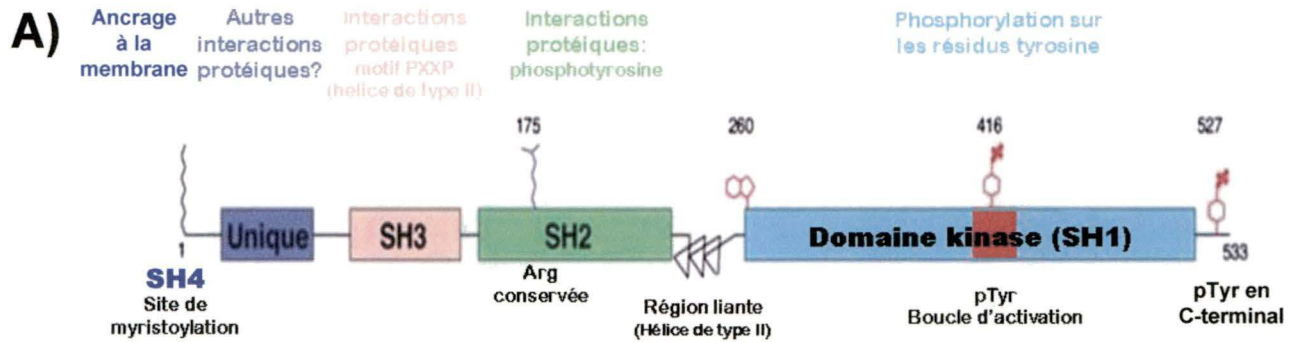
4. Les tyrosine kinases membres de la famille Src (TKs Src)

Les tyrosine kinases membres de la famille Src (TKs Src) comptent plus de 10 membres dont la taille varie de 52 à 62 kDa (Thomas et Brugge, 1997). Cette famille est divisée en trois sous-familles selon la distribution tissulaire des membres (Thomas et Brugge, 1997). Dans la première sous-famille, il y a Src (p60^{Src}), Fyn (p59^{Fyn}) et Yes (p62^{Yes}) qui sont exprimées de façon ubiquitaire (Brown et Cooper, 1996). Dans la deuxième sous-famille, il y a Lyn, Hck, Frg, Blk et Lck qui sont exprimées principalement chez les tissus hématopoïétiques (Bolen et Brugge, 1997). Finalement, il y a Rak (p54^{Rak}) et Iyk/Bsk qui sont exprimées chez les tissus épithéliaux (Lee et al., 1994; Oberg-Welsh et Welsh, 1995).

4.1 Les domaines protéiques des TKs Src

Les TKs Src possèdent un certain degré d'homologie dans leur séquence (Figure 5A). Ces régions d'homologies définissent six domaines fonctionnels : le domaine SH4 («Src homology 4»), la séquence unique, le domaine SH3, le domaine SH2, le domaine catalytique ou SH1 et le domaine de régulation négative contenant un résidu tyrosine hautement conservé (Thomas et Brugge, 1997). Le domaine SH4, situé en N-terminal, contient un site de myristoylation et peut aussi contenir un site de palmitoylation (Brown et Cooper, 1996). Ces modifications post-traductionnelles permettent l'ancrage des TKs Src aux diverses membranes cellulaires, dont la membrane plasmique. Les TKs Src sont souvent concentrées dans différents sous-domaines de cette dernière, comme les cavéolae et les plaques d'adhésion focalisées (Kaplan et al., 1994; Robbins et al., 1995; Thomas et Brugge, 1997). Bien que la myristoylation et la palmitoylation ancrent les TKs Src aux membranes, il y a quand même des TKs Src libres dans le cytosol (Brown et Cooper, 1996). La séquence unique est une séquence de 50 à 70 acides aminés qui est distincte pour chaque TKs Src (Thomas et Brugge, 1997). Son rôle n'est pas défini pour la plupart des TKs Src, mais des études démontrent qu'elle pourrait être impliquée dans des interactions protéine-protéine (ex : association des co-récepteurs CD4 et CD8 des lymphocytes médiée par Lck (Veillette et al., 1988)). Les interactions médiées par la séquence unique diffèrent d'une TKs Src à l'autre. L'utilisation d'une protéine chimère de Src contenant la séquence unique de Yes a permis de démontrer que cette dernière ne pouvait substituer la séquence unique de Src pour médier les interactions impliquant celle-ci (Summy et al., 2003a). Ceci supporte la notion d'interactions et de fonctions

Figure 5. Structure primaire et activation des TKs Src (A) Représentation schématique de la structure primaire des TKs Src. Le site de myristoylation ou domaine SH4 («Src homology»), situé en N-terminal, est impliqué dans la localisation membranaire des TKs Src. La séquence unique, le domaine SH3 et le domaine SH2 sont impliqués dans les interactions intra- et intermoléculaires, régulant ainsi l'activation, l'activité et les interactions avec les différents substrats. Le domaine kinase (SH1) est responsable de la phosphorylation sur les résidus tyrosine. Ce domaine contient une boucle d'activation dans laquelle il y a la tyrosine qui se fait autophosphorylée (pTyr 416). En C-terminal, on retrouve une tyrosine (pTyr527) qui est importante pour la régulation de l'activité des TKs Src. *(Schéma adapté de Boggon et Eck, 2004).* **(B) Activation des TKs Src.** Le panneau de gauche représente c-Src dans son état d'activité basale dans laquelle la tyrosine (Y) en position 527 (chez le poulet) est phosphorylée (P) et interagit avec le domaine SH2. Il y a aussi interaction entre le domaine SH3 et la région liante, située entre le domaine SH2 et le domaine catalytique. Comme le démontre le panneau central, lorsqu'il y a activation, il y a déphosphorylation de la tyrosine 527. Il y a aussi activation de c-Src lorsque des ligands lient les domaines SH2 ou SH3 avec une plus grande affinité que celle des interactions intramoléculaires. Dans tous ces cas, il y a perte des interactions intramoléculaires impliquant les domaines SH2 et SH3, amenant ainsi un dépliement de la kinase. Il y a alors autophosphorylation de la tyrosine 416 (pY416) située dans le domaine catalytique, plus précisément dans la boucle d'activation. Le panneau de droite représente la conformation de c-Src lorsqu'elle est pleinement activée, i.e. lorsqu'elle est dépliée, phosphorylée sur la tyrosine 416 (pY416) et déphosphorylée sur la tyrosine 527 (Y527). *(Schéma adapté de Martin, 2001).*



distinctes pour ce domaine (Boggon et Eck, 2004). En continuant vers la partie C-terminale des TKs Src, les deux domaines suivants ne possèdent pas d'activité enzymatique, mais ils sont impliqués dans les interactions inter- et intramoléculaires (Thomas et Brugge, 1997). Les domaines SH2 et SH3 sont des domaines d'interactions protéine-protéine. De par ces interactions, ils régularisent la localisation des TKs Src, le recrutement des substrats et l'activité catalytique de ces kinases (Thomas et Brugge, 1997). Le domaine SH3 permet l'interaction avec une courte séquence riche en proline présentant le motif PXXP, où P est une proline et X n'importe quel autre acide aminé. Le domaine SH2, quant à lui, interagit avec une courte séquence d'acides aminés contenant une tyrosine phosphorylée (Brown et Cooper, 1996; Thomas et Brugge, 1997). Plusieurs protéines interagissent avec les TKs Src via le SH2, le SH3 ou les deux comme par exemple la sous-unité p85 de la PI3-K ou encore Fak (Thomas et Brugge, 1997; Playford et Schaller, 2004). Pour sa part, le domaine kinase ou domaine SH1 est responsable de l'activité tyrosine kinase, donc de la phosphorylation sur les résidus tyrosine des différents substrats (Thomas et Brugge, 1997). Finalement, le résidu tyrosine en C-terminal est un site de phosphorylation servant à l'autoinhibition des TKs Src (Thomas et Brugge, 1997). Il est ainsi impliqué dans la régulation de l'activité catalytique des TKs Src (voir Section 4.2).

4.2 L'activation des TKs Src et leur régulation

Les TKs Src possèdent en C-terminal une tyrosine qui est hautement conservée (Brown et Cooper, 1996). Pour c-Src, elle se retrouve à la position 527 chez le poulet et à

la position 530 chez l'humain (Copper et al., 1986 ; Abram et Courtneidge, 2000). Son état de phosphorylation régule l'activation des TKs Src puisque cette tyrosine sert de site d'autoinhibition (Copper et al., 1986 ; Thomas et Brugge, 1997). Lorsque les TKs Src sont dans un état inactif (Figure 5B), cette tyrosine est phosphorylée et elle interagit avec son domaine SH2. Dans cet état, il y a aussi des interactions intramoléculaires entre le domaine SH3 et la région liante («linker») située entre le domaine SH2 et le domaine catalytique (Sicheri et al., 1997 ; Xu et al., 1997). Pour qu'il y ait activation des TKs Src, il doit y avoir déphosphorylation de la tyrosine régulatrice (Y527 pour c-Src) par une phosphatase comme PTP α , PTP1B ou encore Shp2 (Playford et Schaller, 2004). Il peut aussi y avoir activation des TKs Src s'il y a la liaison aux domaines SH2 ou SH3 de ligands, comme par exemple le récepteur au PDGF, l'arrestine ou encore la paxilline (Brown et Cooper, 1996; Martin, 2001; Boggon et Eck, 2004). Les ligands lient alors ces domaines avec une plus grande affinité que les interactions intramoléculaires. Ces divers mécanismes amèneront un dépliement de la protéine, car il y a perte des interactions entre le domaine SH2 et la tyrosine phosphorylée ainsi qu'entre le domaine SH3 et la région liante (Thomas et Brugge, 1997; Boggon et Eck, 2004). Pour être pleinement activée, les TKs Src doivent s'autophosphoryler sur une tyrosine située dans leur domaine catalytique, engendrant alors une boucle d'activation. Pour c-Src du poulet, cette autophosphorylation s'effectue sur la tyrosine 416 (tyrosine 419 pour c-Src humain) (Thomas et Brugge, 1997; Boggon et Eck, 2004). Lorsqu'il y a inactivation des TKs Src, la tyrosine régulatrice est phosphorylée par la kinase spécifique à la partie C-terminal de Src (C-terminal Src kinase) (Csk) (Nada et al., 1991). Il y a alors rétablissement des interactions intramoléculaires qui stabilisent l'état inactif des TKs Src (Sicheri et al., 1997 ; Xu et al., 1997).

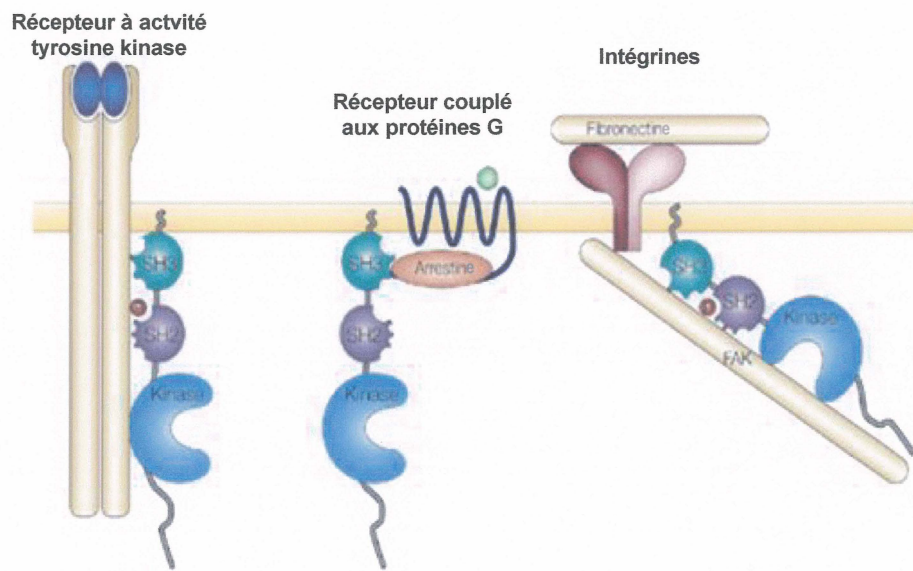
4.3 Implications des TKs Src dans les divers processus cellulaires

De par leur activité kinase, les TKs Src sont des joueuses majeures dans la transduction de signaux (Parsons et Parsons, 2004; Thomas et Brugge, 1997). Elles sont ainsi impliquées dans plusieurs processus cellulaires tels que l'adhésion, la migration/étalement, la prolifération, la réorganisation du cytosquelette, la différenciation et la survie (Parsons et Parsons, 2004; Thomas et Brugge, 1997) (Figure 2; Figure 6B). Cette grande diversité d'actions s'explique par le fait que ces tyrosines kinases peuvent s'associer à plusieurs types de récepteurs cellulaires et ainsi phosphoryler de nombreux substrats faisant partie de la signalisation cytoplasmique (Figure 6A et 6B). Les TKs Src sont des activateurs/effecteurs de plusieurs voies de signalisation (Parsons et Parsons, 2004; Martin, 2001; Thomas et Brugge, 1997). Par exemple, les TKs Src peuvent être activées par des récepteurs à activité tyrosine kinase (Bromann et al., 2004; Luttrell et al., 1988; Thomas et Brugge, 1997), par des intégrines (Playford et Schaller, 2004; Hirst et al., 1986; Giancotti et Ruoslahti, 1999), par des récepteurs couplés aux protéines G (Luttrell et Luttrell, 2004; Rodriguez-Fernandez et Rozengurt, 1996) et par des récepteurs de cytokines (Thomas et Brugge, 1997). Suite à leur activation, les TKs Src phosphoryleront plusieurs dizaines de substrats qui sont impliqués dans divers processus cellulaires. Il y a des enzymes comme la sous-unité p85 de la PI3-K, Fak et Ras, des protéines structurales comme les cavéolines et la paxilline ainsi que des protéines adaptatrices comme Shc (Brown et Cooper, 1996; Thomas et Brugge, 1997). Les TKs Src permettent aussi des intercommunications entre des voies de signalisation et les différents types de récepteurs. Par exemple, les TKs Src peuvent activer les récepteurs aux facteurs

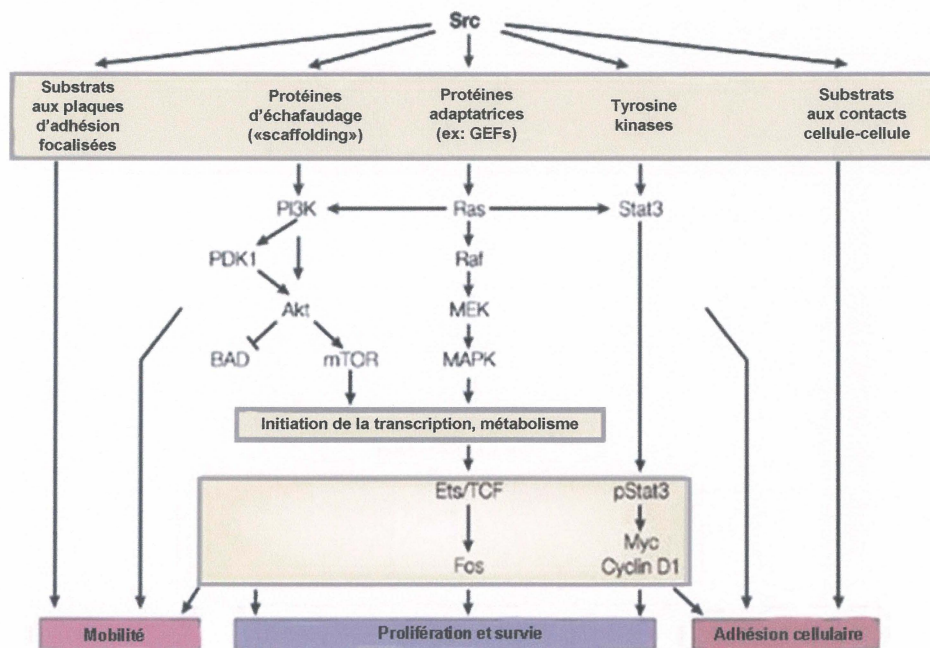
Figure 6. *Implications des TKs Src médiées par leurs associations et leurs substrats dans les divers processus cellulaires. (A) Associations avec divers types de récepteurs.* Les TKs Src sont activées par plusieurs types de récepteurs. Les TKs Src sont activées, entre autre, par les récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK) (droite), les récepteurs couplés aux protéines G (centre) et les intégrines (gauche). Les TKs Src sont activées par des interactions entre leurs domaines SH2 et/ou SH3 et les ligands. Pour les RTK, une tyrosine phosphorylée lie le SH2. Pour les récepteurs couplés aux protéines G, il y a liaison via le SH3 et pour les intégrines, le domaine SH2 des TKs Src lie la tyrosine autophosphorylée de Fak. *(Schéma adapté de Martin, 2001).* **(B) Signalisation par les TKs Src.** Src phosphoryle divers substrats comme des protéines des plaques d'adhésion focalisées, des protéines d'échafaudages («scaffolding»), des protéines adaptatrices, des tyrosine kinases et des substrats aux contacts cellule-cellule. Les voies de signalisation activées (ex : MAPK, PI3-K, Stat) régulent plusieurs processus cellulaires comme la synthèse protéique, l'expression de gène, l'assemblage du cytosquelette, la mobilité, la prolifération, la survie et l'adhésion cellulaire. (Les voies de signalisation montrées ne sont que quelques exemples des voies activées et elles sont simplifiées afin d'alléger le dessin). *(Schéma adapté de Martin, 2001).*

Abréviations: Akt = kinase Akt; Bad = homologue Bad; Cyclin D1 = cycline D1; Ets/TCF = Facteur de transcription Ets/TCF; Fos = facteur de transcription c-Fos; GEFs = facteurs d'échange de nucléotides à guanine; MAPK = protéine kinase activée par des mytogènes; MEK = MAPK/ERK kinase; mTOR = *Mammalian target of rapamycin*; Myc = facteur de transcription c-Myc; PDK1 = kinase dépendante des lipides phosphatidylinositol-1; PI3-K = phosphatidylinositol 3-kinase; pStat3 = phospho-Stat3; Raf = kinase Raf; Ras = GTPase Ras; Src = kinase Src; Stat3 = Transducteur de signal et activateur de transcription 3.

A)



B)



de croissances, suite à leur propre activation par les récepteurs aux protéines G (Luttrell et Luttrell, 2004). Les TKs Src médient aussi des intercommunications entre les récepteurs aux facteurs de croissance et les récepteurs aux stéroïdes (Shupnik, 2004), de même qu'entre les récepteurs aux facteurs de croissance et les protéines de la famille des transducteurs de signal et activateurs de transcription (STAT) (Silva, 2004). Les TKs Src sont responsables de la régulation de certaines fonctions spécialisées, notamment chez les neurones, les cellules T et les cellules B (Parsons et Parsons, 2004).

4.3.1 Les TKs Src et la signalisation par les intégrines : implication dans la survie

Les tyrosine kinases membres de la famille Src occupent un rôle de premier plan dans la signalisation par les intégrines (voir Section 3.2 et Figure 2). Comme mentionné précédemment, les intégrines forment des plaques d'adhésion focalisées lorsqu'elles se lient à leurs ligands (Burridge et Chrzanowska-Wodnicka, 1996). Des études ont démontré que les TKs Src se retrouvaient dans ces plaques sous leur forme active, puisqu'il y a présence de substrats tyrosine phosphorylés par les TKs Src comme Fak, p130^{Cas} et la paxilline (Glenney et Zokas, 1989; Playford et Schaller, 2004). En plus des interactions au sein des plaques d'adhésion focalisées, il a été démontré qu'il y avait des interactions directes entre certaines TKs Src et des sous-unités d'intégrines comme la sous-unité $\beta 3$ (Arias-Salgado et al., 2003). De par leur activité kinase et les différentes interactions, les TKs Src mèneront à l'activation de plusieurs voies de signalisation, dont certaines sont impliquées dans la survie cellulaire (Pour plus de détails sur la signalisation par les intégrines, voir la Section 3 et Figure 2). Par exemple, Src est

impliquée dans l'activation des voies de la PI3-K et des MEK/Erk via Fak (Giancotti et Ruoslahti, 1999).

4.3.1.1 Interactions Fak-TKs Src

Lorsqu'il y a autophosphorylation de Fak sur la tyrosine 397, ceci permet le recrutement de TKs Src via le domaine SH2 de ces dernières (Schaller et al., 1994 ; Schlaepfer et al., 1994). Il y aurait alors bris des interactions intramoléculaires et déphosphorylation de la tyrosine régulatrice (ex :Tyr 527). Ceci permettrait aux TKs Src de phosphoryler certaines tyrosines de Fak, soit les tyrosines 407, 576, 577, 861 et 925 (Schaller et al., 1994 ; Schlaepfer et al., 1994). Les tyrosines 576 et 577 se retrouvent dans le site catalytique de Fak et celles-ci doivent être phosphorylées pour que Fak soit pleinement active. Il a été montré que Fak et Src interagissaient et que cette interaction était nécessaire à la survie cellulaire. En effet, s'il y a inhibition de ces deux protéines simultanément, le pourcentage de mort cellulaire est grandement accru chez les cellules cancéreuses (Golubovskaya et al., 2003). Toutefois l'inhibition de seulement une des deux protéines cause aussi la mort cellulaire, mais le pourcentage est alors moindre. Dans ce cas, des signaux de survie sont transmis, notamment ceux provenant de la voie de la PI3-K/Akt, puisque Src active Akt de façon PI3-K-indépendante et Fak, quant à elle, active la PI3-K, qui à son tour active Akt (Golubovskaya et al., 2003).

4.4 Les TKs Src et le cancer

L'activité des TKs Src est connue pour être plus élevée dans plusieurs cancers comme le cancer du côlon, du pancréas et de la glande mammaire (Summy et Gallick, 2003; Playford et Schaller, 2004). Les mécanismes expliquant cette hausse d'activité sont reliés à une hausse d'expression ou à une activation aberrante des TKs Src (Summy et Gallick, 2003; Playford et Schaller, 2004). Ceci peut se traduire par une dérégulation de la déphosphorylation de la tyrosine en C-terminal, par une augmentation d'expression et/ou de stabilité des TKs Src ou encore par une perte des protéines régulatrices (ex : Csk) (Frame et al., 2002 ; Playford et Schaller, 2004). De plus, des mutations de Src ont été observées chez certaines tumeurs de cancers de côlon (Irby et al., 2000). L'expression de Src est connue pour augmenter avec la progression du cancer, suggérant qu'elle est plus active dans les cellules métastatiques (Summy et Gallick, 2003; Playford et Schaller, 2004). Les cellules présentant un haut taux de Src active démontrent une prolifération aberrante, une augmentation de mobilité et d'invasion, une résistance à l'apoptose et de l'angiogénèse (Summy et Gallick, 2003). Un dérèglement de l'activité des TKs Src promeut donc la tumorigénèse. Il ne faut pas négliger que plusieurs des TKs Src cellulaires possèdent des homologues viraux (ex : v-Src , v-Yes), qui sont des oncogènes puisqu'ils causent la transformation cellulaire. Les TKs Src cellulaires (ex : c-Src, c-Yes) sont donc considérées comme des proto-oncogènes (Thomas et Brugge, 1997; Summy et al., 2003a).

4.5 Implications distinctes des TKs Src

Bien que les TKs Src présentent une grande homologie et qu'elles exercent des rôles, dont certains sont redondants, des études ont démontré qu'elles pouvaient être exprimées et/ou activées distinctement selon le type cellulaire, le stimulus et le stade de différenciation. Il peut ainsi y avoir des implications différentes des TKs Src dans divers processus cellulaires (ex; prolifération, différenciation, adhésion, migration/étalement, organisation du cytosquelette) (Summy et al., 2003a et b). Chez les souris ayant un gène de TKs Src délété, les phénotypes diffèrent selon le gène de la TKs Src délété. Les tissus atteints peuvent également différer (Thomas et Brugge, 1997; Summy et al., 2003a et b). Lors d'études *in vitro*, des distinctions pour la survie cellulaire et/ou l'apoptose ont aussi été démontrées. La transformation de cellules cryptales intestinales de rat IEC-18 par v-Src confère une plus grande résistance à l'anoïkose chez ces cellules (Loza-Coll et al., 2002). Chez les cellules myogéniques, Src, Fyn et Yes ont des profils d'expression distincts entre les myoblastes (cellules indifférenciées) et les myotubes (cellules différenciées) (Laprise et al., 2002). De plus, Fyn est active majoritairement chez les myotubes. S'il y a diminution de l'activité de Fyn, ceci corrèle avec une augmentation d'apoptose/anoïkose chez les myotubes (Laprise et al., 2002). Lors d'hyperosmolarité chez les hépatocytes, l'apoptose induite via CD95 et impliquant l'activation du récepteur à l'EGF est médiée seulement par Yes (Reinehr et al., 2004).

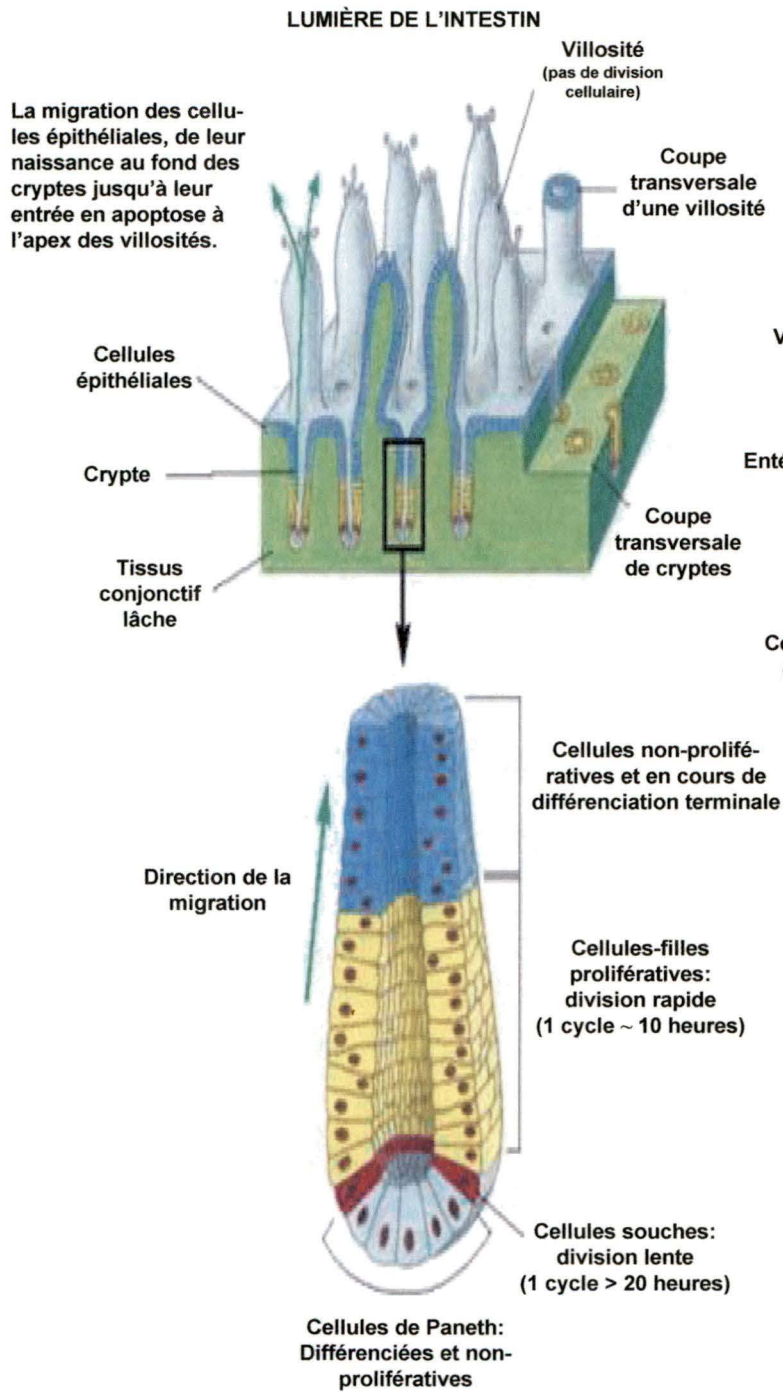
5. *L'épithélium intestinal*

L'épithélium intestinal humain est un épithélium simple cylindrique. Notamment grâce à de son renouvellement constant et rapide, de la compartimentalisation des divers processus cellulaires et de son plein développement tôt dans la vie foetale, l'épithélium intestinal est un bon modèle pour étudier les phénomènes cellulaires associées au renouvellement tissulaire tels que la prolifération, la différenciation et l'apoptose (Potten, 1997; Gauthier et al., 2001) (Figure 7). En effet, il y a prolifération des cellules souches et des cellules immatures au fond des cryptes. Les cellules-filles migrent ensuite le long de la crypte, tout en entamant un processus de différenciation. Elles continuent toutefois leur migration jusqu'à l'atteinte de l'apex des villosités, où elles entrent en apoptose et sont exfoliées dans la lumière intestinale (Potten, 1997 : Albert et al., 2002; Pageot et al., 2000). Ce renouvellement s'effectue le long de l'unité morphologique et fonctionnelle de l'épithélium intestinal qu'est l'axe crypte-villosité (Figure 7). Cet axe est compartimentalisé. Les cellules souches, les entérocytes indifférenciés, ceux en voie de différenciation et les cellules de Paneth sont retrouvés strictement dans les cryptes. Les villosités, quant à elles, sont constituées d'entérocytes pleinement différenciés, de cellules à goblet et des cellules entéroendocrines. Ces deux derniers types de cellules sont aussi retrouvés dans les cryptes, mais pas au fond de celles-ci, où les cellules de Paneth sont retrouvées (Albert et al., 2002). La jonction crypte-villosité est la limite physique où les entérocytes auront acquis pleinement leurs caractéristiques fonctionnelles comme l'expression d'enzymes de la bordure en brosse (ex : la sucrase-isomaltase et la lactase phlorizin-hydrolase) (Ménard et Beaulieu, 1995; Pageot et al., 2000).

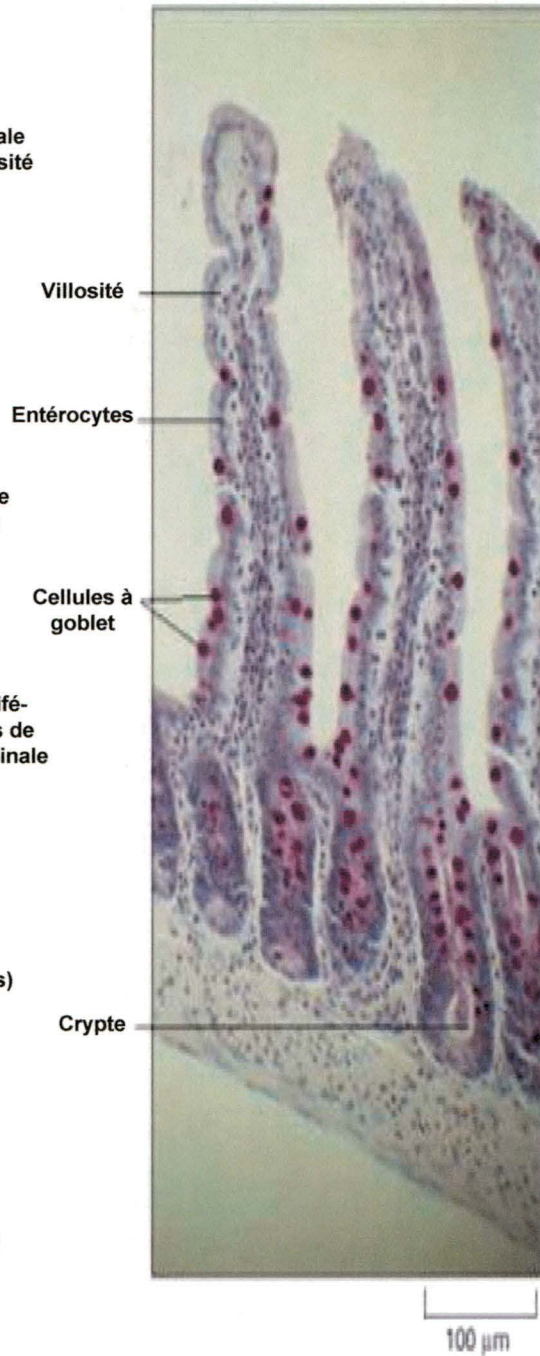
Figure 7. *L'axe crypte-villosité : unité morphologique et fonctionnelle de l'intestin grêle*

(A) *Patron du renouvellement cellulaire le long de l'axe crypte-villosité.* Il y a prolifération des cellules souches et des cellules immatures au fond des cryptes. Les cellules-filles migrent ensuite le long de la crypte, tout en entamant un processus de différenciation, pour être pleinement différenciées à la sortie des cryptes. (Les flèches indiquent la direction de la migration des cellules vers les villosités). Elles continuent leur migration jusqu'à l'atteinte de l'apex des villosités, où elles entrent en apoptose et sont exfoliées dans la lumière intestinale. Au fond des cryptes, on retrouve aussi les cellules de Paneth, qui sont des cellules non-prolifératives et différenciées. *(Schéma adapté de Albert et al., 2002).* **(B)** *Photographie d'une coupe d'intestin grêle montrant l'axe crypte-villosité.* Les entérocytes matures ou cellules absorbantes de la bordure en brosse se retrouvent le long des villosités. Noter la présence de cellules à goblet (colorées en rouge) partout le long de l'axe et leur dispersion entre les autres types cellulaires. Les cellules entéroendocrines sont moins nombreuses et plus difficilement identifiables sans l'usage de colorants spécifiques. *(Adapté de Albert et al., 2002).*

A)



B)



5.1 Mécanismes de régulation de la survie et de l'apoptose/anoïkose distincts selon l'état de différenciation entérocytaire

L'apoptose retrouvée le long de l'axe crypte-villosité est régulisée par des mécanismes moléculaires qui sont de plus en plus connus. Chez l'humain, l'apparition de cellules apoptotiques aux villosités est notée à partir de la 18^{ème} semaine de gestation (Vachon et al., 2000). Il est admis que l'apoptose observée à l'apex des villosités est de l'anoïkose puisqu'elle dépendrait des interactions cellule-matrice (Potten, 1997; Grossmann, 1998; Grossmann, 2002; Gauthier et al., 2001). Elle constitue un processus normal pour les cellules épithéliales intestinales différenciées. L'apoptose observée chez les cellules cryptales est peu fréquente et sert uniquement à enlever les cellules défectueuses ou endommagées (Potten; 1997; Tarnawski et Szabo, 2001). Des études *in vivo* et *in vitro* ont montré que la susceptibilité à entrer en apoptose diffère selon l'état de différenciation des cellules épithéliales intestinales. Les cellules épithéliales intestinales différenciées présentent une plus grande susceptibilité à entrer en apoptose que les cellules épithéliales intestinales indifférenciées (Vachon et al., 2000; Gauthier et al., 2001; Vachon et al., 2002; Dufour et al., 2004). Cette différence apparente quant au devenir des entérocytes indifférenciés et différenciés suggère des mécanismes de régulation de la survie distincts le long de l'axe crypte-villosité (Potten; 1997; Grossmann, 1998; Gauthier et al., 2001). Ce concept est d'ailleurs supporté par plusieurs études antérieures qui ont démontré des différences selon l'état de différenciation des cellules épithéliales intestinales (Figure 8).

Figure 8. Mécanismes distincts de régulation de la survie et/ou de l'apoptose/anoïkose selon l'état de différenciation des cellules épithéliales intestinales. (A) Chez les entérocytes indifférenciés: les intégrines $\beta 1$, Fak, PI3-K et Akt-1 sont nécessaires pour la survie et la suppression de l'anoïkose, tandis que p38 β est requise pour l'induction du processus. Akt-2 et la voie MEK/Erk ne sont pas impliquées dans la suppression ou l'induction de l'anoïkose, bien que la signalisation intégrines $\beta 1$ -Fak contribue à leur stimulation et Akt-2 est d'ailleurs indépendante de la PI3-K. p38 α et p38 γ sont exprimées, mais elles ne sont pas impliquées dans la survie ou l'induction de l'anoïkose. L'intégrine $\alpha 6\beta 4$ ne participe pas dans le maintien de la survie. p38 δ et Akt-3 ne sont pas exprimées. **(B)** Chez les entérocytes différenciés: les intégrines $\beta 1$, Fak, PI3-K et Akt-1 demeurent nécessaire pour la suppression de l'anoïkose, tandis que c'est p38 δ qui est requise pour l'induction du processus. p38 α et p38 γ sont exprimées et ne sont toujours pas impliquées dans la survie ou l'induction de l'anoïkose. La voie MEK/Erk demeure influençable par la signalisation intégrines $\beta 1$ -Fak et elle contribue de façon mineure dans la survie. Ici, l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ contribue à la suppression de l'anoïkose, mais de façon mineure. Akt-2 est toujours indépendante de PI3-K en plus d'être maintenant indépendante de la signalisation intégrines $\beta 1$ -Fak. Elle ne joue toujours pas de rôle dans la suppression ou l'induction de l'anoïkose. Enfin, Akt-3 et p38 β ne sont pas exprimées. Noter que les homologues Bcl-2 prédominants sont distincts selon l'état de différenciation des entérocytes.

Cellule épithéliale intestinale indifférenciée

(s'applique aux cellules HIEC, Caco-2/15 -2 PC)

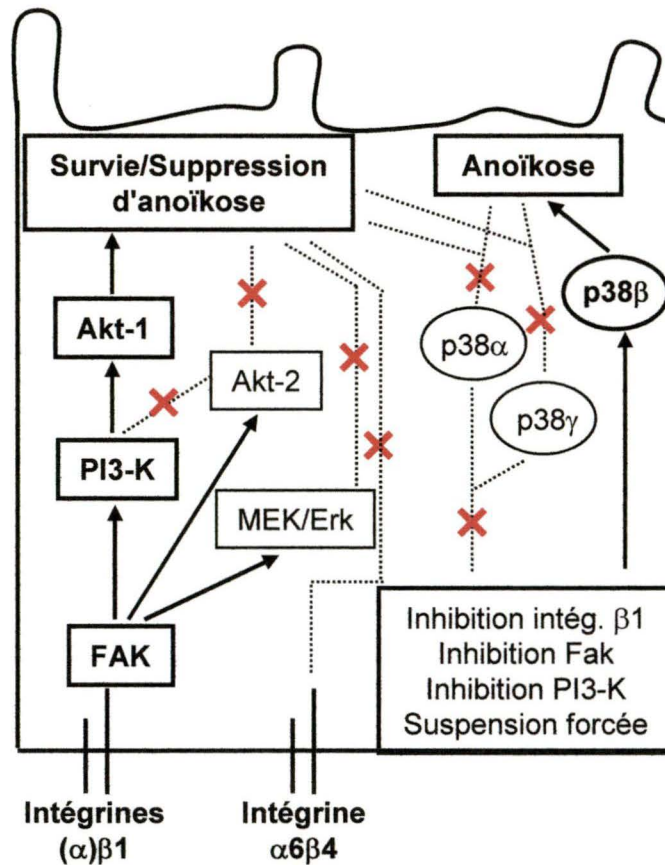
- Homologues Bcl-2 prédominants:
Anti-apoptotiques: Bcl-2, Bcl-X_L
Pro-apoptotiques: Bax
- p38 δ , Akt-3: *pas exprimées*

Cellule épithéliale intestinale différenciée

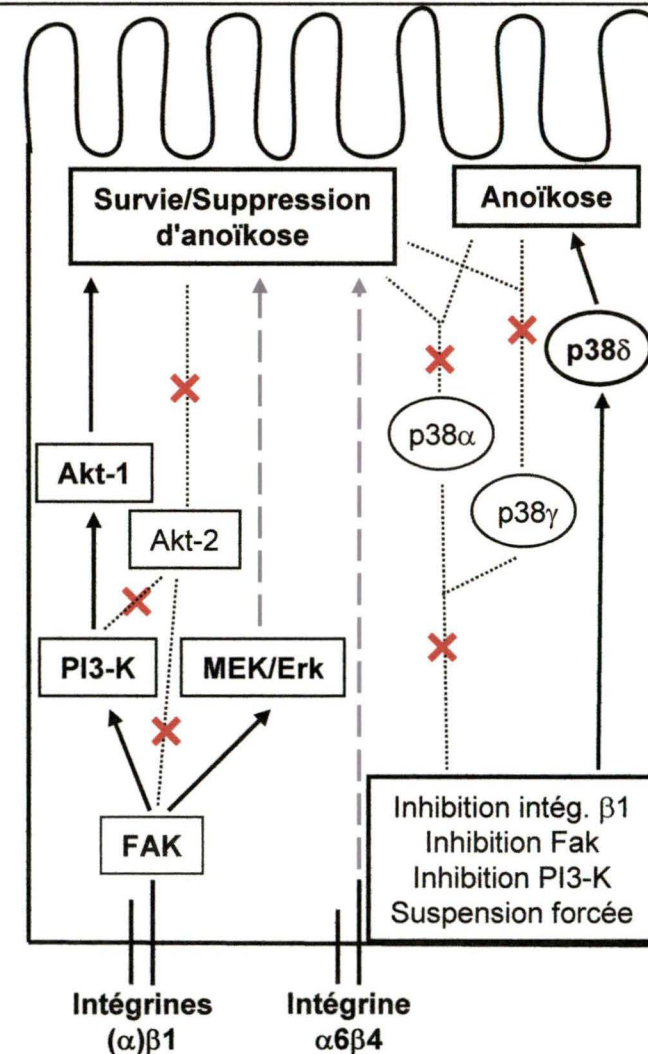
(s'applique aux cellules PCDE, Caco-2/15 30 PC)

- Homologues Bcl-2 prédominants:
Anti-apoptotiques: Mcl-1
Pro-apoptotiques: Bak, Bad
- p38 β , Akt-3: *pas exprimées*

A)



B)



5.1.1 Expression différentielle des homologues Bcl-2 le long de l'axe crypte-villosité

In vivo, il y a établissement d'un gradient d'expression des différents homologues Bcl-2 pro- et anti-apoptotiques le long de l'axe crypte-villosité. L'établissement de ce gradient commence par l'expression d'homologues Bcl-2 dès la 9^{ième} semaine de gestation, mais il n'est établi complètement qu'à la mi-gestation (18-20 semaines) (Vachon et al., 2000). Ce gradient sera d'ailleurs celui retrouvé chez l'intestin adulte (Vachon et al., 2000). L'expression des homologues Bcl-2 est ainsi compartimentalisée le long de l'axe crypte-villosité : Bcl-2, Bcl-X_L et Bax sont retrouvés principalement chez les cellules cryptales indifférenciées et Mcl-1, Bak et Bad sont retrouvés principalement chez les cellules différenciées des villosités (Vachon et al., 2000) (Figure 8).

In vitro, il a été démontré chez les Caco-2/15 que le profil d'expression des homologues Bcl-2 pro- et anti-apoptotiques change selon l'état de différenciation et qu'il s'établit graduellement au cours de la différenciation des cellules épithéliales intestinales (Gauthier et al., 2001). Bien que tous exprimés tout au cours de la différenciation, il y a augmentation de l'expression des homologues anti-apoptotiques Bcl-2, Mcl-1 et celle du pro-apoptotique Bax au cours de la différenciation. Par contre, il y a une diminution de l'expression de Bcl-X_L, un anti-apoptotique, ainsi que celles de Bak et de Bad, deux pro-apoptotiques, au cours du processus (Gauthier et al., 2001). Leur expression est modulée par différentes voies de signalisation et ceci selon l'état de différenciation (Gauthier et al., 2001) (voir les Sections 5.1.2 à 5.1.5). Il faut toutefois noter que le profil d'expression des homologues Bcl-2 *in vitro* diffère quelque peu de celui *in vivo*, faisant en sorte que le

profil *in vitro* chez les Caco-2/15 correspond au profil de l'axe crypte-villosité retrouvé à la mi-gestation chez le côlon fœtal (Vachon et al., 2000; Vachon et al., 2001; Grossmann et al., 1998 ; Gauthier et al., 2001).

5.1.2 La voie PI3-K/Akt et l'état de différenciation des cellules épithéliales intestinales

Bien que la voie PI3-K/Akt est impliquée dans la survie des cellules épithéliales intestinales *in vitro*, peu importe leur stade de différenciation (Gauthier et al., 2001; Dufour et al., 2004) (Figure 8), elle est plus importante pour la survie des cellules indifférenciées que pour celles différenciées comme démontré chez les Caco-2/15 et les HIEC (Gauthier et al., 2001). Chez les cellules indifférenciées, la voie de la PI3-K promeut l'expression de Bcl-X_L et Mcl-1, mais défavorise celle de Bax (Gauthier et al., 2001). Chez les cellules différenciées, la voie de la PI3-K promeut seulement l'expression de Bax (Gauthier et al., 2001).

Pour ce qui est des isoformes d'Akt (Akt-1, Akt-2 et Akt-3), ils ont des profils d'expression et d'activation distincts selon l'état de différenciation comme démontré chez les Caco-2/15 et les HIEC *in vitro*. Tout d'abord, Akt-3 n'est pas exprimée chez les cellules épithéliales intestinales, peu importe l'état de différenciation (Dufour et al., 2004). Malgré que Akt-1 et Akt-2 soient exprimées tout au cours de la différenciation, leur profil d'expression sont divergents puisque l'expression d'Akt-1 augmente au cours de la différenciation, tandis que celle d'Akt-2 diminue (Dufour et al., 2004). La même

tendance est aussi retrouvée pour leur niveaux d'activation respectifs (Dufour et al., 2004). Bien que l'activation d'Akt-1 et d'Akt-2 dépendent de la signalisation intégrines $\beta 1$ /Fak chez les cellules indifférenciées, seule l'activation d'Akt-1 dépend de cette signalisation chez les cellules différenciées puisque l'activation d'Akt-2 en est indépendante (Dufour et al., 2004). Il y a d'autres oppositions entre Akt-1 et Akt-2, mais elles ne dépendent pas de l'état de différenciation : 1) Akt-1 est essentielle à la survie, mais Akt-2 ne l'est pas (Dufour et al., 2004); 2) l'activation d'Akt-1 est dépendante de la PI3-K, mais pas celle de Akt-2 (Dufour et al., 2004) (Figure 8).

5.1.3 Implication différentielle de la voie MEK/Erk dans la survie des cellules épithéliales intestinales selon leur état de différenciation

Toujours chez les Caco-2/15 et les HIEC *in vitro*, il a été démontré que malgré une augmentation d'expression de $p42^{Erk-2}/p44^{Erk-1}$ au cours de la différenciation des cellules épithéliales intestinales, il y a une diminution de leur activation (Gauthier et al., 2001; Aliaga et al., 1999). De plus, seule la survie des cellules différenciées dépend de la voie MEK/Erk, mais sa contribution est toutefois mineure (Gauthier et al., 2001). La survie des cellules indifférenciées en est indépendante (Gauthier et al., 2001; Harnois et al., 2004) (Figure 8). Cette voie promeut l'expression de Bcl-2 et de Bad chez les cellules indifférenciées et chez les cellules différenciées, c'est l'expression de Bcl-2, Bcl-X_L, Bax, Bak et Bad qui est promue (Gauthier et al., 2001; Harnois et al., 2004).

5.1.4 Les isoformes de p38 et l'état de différenciation des cellules épithéliales intestinales

Les profils d'expression et l'implication des isoformes de p38 (p38 α , p38 β , p38 γ et p38 δ) varient selon l'état de différenciation des cellules épithéliales intestinales. Tout d'abord, chez les HIEC, les Caco-2/15 et les PCDE cultivées *in vitro*, l'isoforme p38 β est exprimée seulement chez les cellules indifférenciées et l'isoforme p38 δ , quant à elle, est exprimée seulement chez les cellules différenciées (Vachon et al., 2002). Pour ce qui est des isoformes p38 α et p38 γ , elles sont exprimées tant chez les cellules indifférenciées que différenciées (Vachon et al., 2002). De plus, il a été démontré que pour induire l'anoïkose, c'est l'isoforme p38 β qui était requise chez les cellules indifférenciées et c'est l'isoforme p38 δ qui l'était chez les cellules différenciées (Vachon et al., 2002). Ces deux isoformes ne promouvoient toutefois pas la survie (Vachon et al., 2002; Harnois et al., 2003). Les isoformes p38 α et p38 γ , quant à elles, ne sont pas impliquées tant dans la promotion de la survie que dans l'induction de l'anoïkose et ce, peu importe le stade de différenciation des cellules épithéliales intestinales (Vachon et al., 2002; Harnois et al., 2003) (Figure 8).

5.1.5 Fak, les intégrines et l'état de différenciation des cellules épithéliales intestinales

Il est reconnu qu'au cours de la différenciation des cellules épithéliales intestinales, notamment chez les Caco-2/15 cultivées *in vitro*, l'expression de Fak augmente, mais que

son activation diminue (Gauthier et al., 2001; Lévy et al., 1998). Bien que Fak soit impliquée dans la survie des cellules épithéliales intestinales peu importe l'état de différenciation, son implication est plus importante pour la survie des cellules différenciées que pour celles indifférenciées (Gauthier et al., 2001) (Figure 8). Fak promeut d'ailleurs, chez les cellules différenciées, l'expression de Bcl-2, Bcl-X_L et Mcl-1, ainsi que celle de Bad, mais elle défavorise celle de Bax et Bak (Gauthier et al., 2001). Chez les cellules indifférenciées, seule l'expression de Mcl-1 est promue par Fak, mais l'expression de Bax et Bak est toujours défavorisée (Gauthier et al., 2001).

Tout comme Fak, qui fait d'ailleurs partie intégrante de leur signalisation, les intégrines $\beta 1$ sont impliquées dans la suppression de l'anoïkose tant chez les cellules indifférenciées que différenciées cultivées *in vitro*, notamment les Caco-2/15 (Gauthier et al., 2001) (Figure 8). De plus, la même tendance quant à l'implication dans la survie des cellules épithéliales intestinales est suivie, soit que les intégrines $\beta 1$ sont plus importantes pour la survie des cellules différenciées que pour celles indifférenciées (Gauthier et al., 2001). Toujours chez les Caco-2/15 et HIEC cultivées *in vitro*, ceci se traduit notamment par des implications différentes de la signalisation intégrines $\beta 1$ -Fak selon l'état de différenciation des cellules épithéliales intestinales. Tout d'abord, bien que l'activation de la PI3-K est dépendante de la signalisation intégrines $\beta 1$ -Fak peu importe l'état de différenciation, ce n'est pas toujours le cas pour les isoformes d'Akt. En effet, l'activation d'Akt-2 est dépendante de cette signalisation chez les cellules indifférenciées, mais en est indépendante chez les cellules différenciées (Figure 8). Par contre, l'activation d'Akt-1 est dépendante de cette signalisation chez les deux états de

différenciation (Dufour et al., 2004). Pour ce qui est de la voie des MEK/Erk, son activation est dépendante de Fak et de la signalisation intégrines $\beta 1$ -Fak, tant chez les cellules indifférenciées que chez les cellules différenciées (Gauthier et al., 2001) (Figure 8). Contrairement aux deux autres voies de signalisation, c'est l'inhibition de la signalisation intégrines $\beta 1$ -Fak, soit par l'inhibition des intégrines $\beta 1$ ou de Fak ou encore par la suspension forcée, qui cause une activation soutenue de p38 β chez les cellules indifférenciées et une activation soutenue de p38 δ chez celles différenciées, corrélant ainsi avec l'induction de l'anoïkose chez les cellules épithéliales intestinales (Vachon et al., 2002). L'activation des isoformes p38 α et p38 γ n'est pas soutenue peu importe le stade de différenciation lors de l'induction d'anoïkose (Vachon et al., 2002) (Figure 8).

En terminant, pour ce qui est de l'intégrine $\alpha 6\beta 4$, une autre intégrine exprimée chez les cellules épithéliales intestinales, elle ne contribue pas à la survie, *in vitro*, des cellules épithéliales intestinales indifférenciées, mais elle contribue de façon mineure à la survie des cellules différenciées chez les Caco-2/15 (Gauthier et al., 2001) (Figure 8). De plus, contrairement aux intégrines $\beta 1$, l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ ne promeut pas l'activation de Fak (Gauthier et al., 2001).

5.2 Les TKs Src et l'épithélium intestinal

Jusqu'à ce jour, la majorité des études menées chez l'épithélium intestinal humain concernant les TKs Src ont porté sur l'activité de celles-ci dans les lignées cellulaires cancéreuses coloniques et dans les tumeurs de la même origine. Il y a ainsi une

augmentation de l'activité de Src et de Yes qui corrèle avec le potentiel malin des cellules cancéreuses (Cartwright et al., 1994; Peña et al., 1995). L'activité et l'expression de Src augmentent au cours de la mitose des cellules carcinomateuses, tandis que l'expression et l'activité de Yes diminuent au même moment (Park et Cartwright, 1995). Il a aussi été démontré que la transcription du gène SRC, l'expression ainsi que l'activité de Src correspondent avec la résistance à l'anoïkose retrouvée chez les cellules cancéreuses métastatiques (Dehm et Bonham, 2004; Windham et al., 2002). De plus, cette augmentation d'activité de Src contribuerait à l'activation d'une voie de signalisation qui diminuerait la sensibilité à l'anoïkose des cellules adhérentes et qui impliquerait l'activation de la kinase Akt (Windham et al., 2002; Golubovskaya et al., 2003).

Toutefois, des études ont aussi été menées chez les cellules intestinales normales de rats (IEC-18). Lorsque transformées par v-Src, seule l'expression de v-Src est suffisante pour induire une résistance à l'anoïkose. Il y a alors une augmentation de l'expression de l'homologue Bcl-2 anti-apoptotique Bcl-X_L médiée par la voie MEK/Erk (Loza-Coll et al., 2002). Le facteur de croissance transformant- α (TGF- α), un ligand du récepteur à l'EGF, inhibe l'anoïkose chez les cellules épithéliales intestinales de rats en contrecarrant la perte d'activité de Src et la diminution d'expression de Bcl-X_L accompagnant le détachement prolongé des cellules (Rosen et al., 2001). L'effet protecteur du TGF- α est dépendant de Src (Rosen et al., 2001) puisqu'il stimule l'activité de Src et qu'il cause une augmentation de l'expression de Bcl-X_L qui est Src-dépendante (Rosen et al., 2001; Loza-Coll et al., 2002). Plus récemment, il a été montré qu'il y avait une augmentation d'activité transitoire de Src et Fyn dans les premières minutes suivant le détachement des

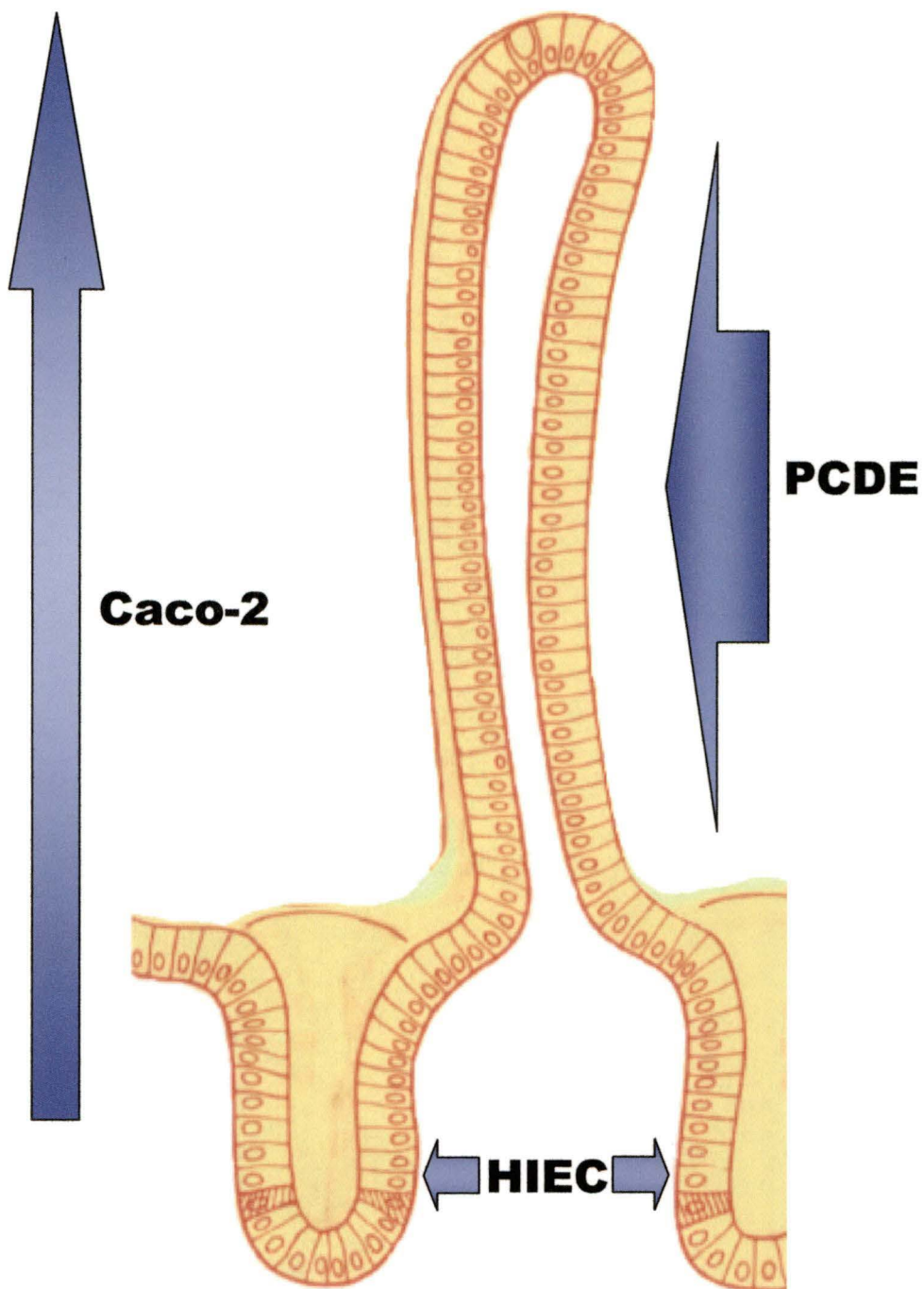
cellules (Loza-Coll et al., 2005). Cette hausse d'activité serait impliquée dans la réversibilité de l'anoïkose jusqu'à 2 heures suivant le détachement des cellules. Ceci offrirait une protection transitoire contre l'anoïkose. La voie de la PI3-K et la phosphorylation de la cavéoline-1 seraient impliquées dans cette protection (Loza-Coll et al., 2005). Ils ont aussi montré que la voie de MEK/Erk agirait en synergie avec les TKs Src pour la protection des cellules contre l'anoïkose (Loza-Coll et al., 2005).

Ainsi, les mécanismes de régulation des TKs Src selon l'état de différenciation et les distinctions entre chacune d'elles sont peu ou pas étudiés chez les cellules épithéliales intestinales humaines.

6 Modèles cellulaires de différenciation épithéliale intestinale *in vitro*

Les cellules de la lignée Caco-2 représentent un excellent modèle *in vitro* pour l'étude de la maturation cellulaire et des fonctions entérocytaires humaines (Figure 9) (Beaulieu et Quaroni, 1991; Vachon et Beaulieu, 1992 ; Pageot et al., 2000). Les cellules Caco-2 proviennent d'un adénocarcinome de côlon humain (Fogh et al., 1977). Les cellules Caco-2 ont la propriété d'entamer un processus de différenciation dès l'atteinte de la confluence. Après 25-30 jours post-confluence (PC), bien qu'elles soient d'origine cancéreuse, elles ont acquis un degré de différenciation entérocytaire morphologique et fonctionnelle qui est similaire au phénotype de l'entérocyte normal pleinement différencié (Pinto et al., 1983; Zweibaum et Chantret, 1989; Vachon et Beaulieu, 1992), tel que retrouvé chez les cellules PCDE (« Primary Cultures of Differentiated

Figure 9. *Modèles cellulaires récapitulant l'axe crypte-villosité de l'intestin grêle humain.* La récapitulation de l'axe crypte-villosité peut s'effectuer en utilisant différentes lignées cellulaires normales. Les cellules exhibant les caractéristiques des cellules de la crypte sont les HIEC. Elles sont prolifératives et indifférenciées. Les cellules exhibant les caractéristiques des cellules des villosités, i.e. non-prolifératives et différenciées, sont les PCDE. Les cellules de la lignée Caco-2, bien qu'originant d'un carcinome de côlon, sont utilisées pour étudier la différenciation des cellules intestinales. Elles entament un processus de différenciation dès l'atteinte de la confluence, pour être pleinement différenciées après 25-30 jours post-confluence. (*Schéma adapté de Pageot et al., 2000*).



Enterocytes ») (Pageot et al., 2000). Chez les cellules Caco-2, l'acquisition graduelle des caractéristiques d'entérocytes différenciés est reconnue comme étant un processus hautement régularisé (Zweibaum et Chantret, 1989; Ménard et Beaulieu, 1994). Les Caco-2 ont toutefois leurs limites notamment à cause de leur origine cancéreuse et colonique. En effet, elles ne sont pas une bonne représentation des cellules épithéliales intestinales indifférenciées normales pour l'étude de certains phénomènes cellulaires, comme par exemple la perte de la prolifération ainsi que l'acquisition des caractéristiques de différenciation. Ceux-ci s'effectuent, chez les Caco-2, selon un patron de mosaïque, i.e. de façon hétérogène au sein de la population cellulaire (Vachon et Beaulieu, 1992 ; Pageot et al., 2000).

Bien qu'elles proviennent d'un adénocarcinome de côlon, les cellules Caco-2 ont un potentiel intéressant puisqu'il n'existe aucun modèle cellulaire humain normal capable de reconstituer pleinement *in vitro* le processus de différenciation observé tout le long de l'axe crypte-villosité humain (Figure 9). Les cellules HIEC-6 (« Human Intestinal Epithelial Cells ») sont des cellules normales de la crypte intestinale. Elles exhibent les caractéristiques morphologiques et fonctionnelles des cellules indifférenciées des cryptes. Elles sont incapables d'entamer un processus de différenciation (Perreault et Beaulieu, 1996; Pageot et al., 2000). Il existe également les PCDE (« Primary Cultures of Differentiated Enterocytes ») qui sont des cultures primaires d'entérocytes normaux pleinement différenciés (Perreault et Beaulieu, 1998 ; Pageot et al., 2000).

Dans le cadre de la présente étude, nous utiliserons la lignée Caco-2/15, un clone provenant de la lignée mère Caco-2 et qui exprime des niveaux élevés du marqueur de différenciation sucrase-isomaltase (Beaulieu et Quaroni, 1991). Les HIEC-6 seront utilisées afin de valider les résultats obtenus avec les Caco-2/15 indifférenciées.

7 Hypothèse et objectifs

Étant donné que : 1) les mécanismes de régulation de la survie et d'apoptose/anoïkose varient selon l'état de différenciation des cellules épithéliales intestinales; 2) ces mécanismes impliquent Fak différemment selon l'état de différenciation; 3) les TKs Src sont des kinases impliquées dans plusieurs des voies de signalisation participant à la régulation de la survie et/ou apoptose chez les cellules épithéliales intestinales; 4) les TKs Src sont reconnues pour faire partie des cassettes de signalisation intégrines-Fak; 5) les différentes TKs Src peuvent jouer des rôles divergents; notre hypothèse de travail est que *les trois TKs Src ubiquitaires, i.e. Src Fyn et Yes, sont exprimées, activées et régulées de façon distincte dans les mécanismes de régulation de la survie et/ou de l'apoptose/anoïkose passant par les cassettes de signalisation intégrines-Fak et ce, selon l'état de différenciation des cellules épithéliales intestinales humaines*. Les objectifs spécifiques du présent projet de recherche nous permettant de vérifier notre hypothèse sont les suivants :

- 1) Analyser la contribution de Src, Fyn et Yes dans la survie des cellules épithéliales intestinales selon l'état de différenciation en analysant chez les cellules Caco-2/15 ainsi que chez les HIEC:
 - i) l'expression et l'activation des différentes TKs Src au cours de la différenciation.
 - ii) l'impact de l'inhibition de l'activité catalytique des TKs Src sur :
 - a) les niveaux d'activation des kinases et
 - b) la susceptibilité à l'apoptose.
- 2) Analyser l'activation de Src, Fyn et Yes vs la signalisation intégrines-Fak chez les cellules Caco-2/15 ainsi que chez les HIEC.
 - i) Analyser l'activation de Fak lors de l'inhibition de l'activité catalytique des TKs Src.
 - ii) Analyser l'activation de Src, Fyn et Yes lors de l'inhibition de Fak et de la signalisation intégrines-Fak.
- 3) Analyser les associations de Src, Fyn et Yes aux cassettes de signalisation de Fak suite à l'inhibition de Fak, de la signalisation intégrines-Fak et suite à l'inhibition de l'activité catalytique des TKs Src chez les cellules Caco-2/15 ainsi que chez les HIEC.

II – MATÉRIELS ET MÉTHODES

1. Culture cellulaire

La lignée cellulaire Caco-2/15 (Beaulieu et al., 1991), un clone provenant de la lignée mère Caco-2 (Pinto et al., 1983) (HTB-37; American Type Culture Collection, Rockville, MD), ainsi que la lignée cellulaire HIEC-6 (Perreault et Beaulieu, 1996) exhibant les caractéristiques morphologiques et fonctionnelles des entérocytes indifférenciés normaux de la crypte intestinale humaine, nous ont été gracieusement données par le Dr J.-F. Beaulieu (Université de Sherbrooke, Sherbrooke, QC). Les cellules Caco-2/15 ont été cultivées dans un milieu de culture DMEM (Invitrogene, Carlsbad, CA) supplémenté de 10%(v/v) de sérum de bovins fœtaux (FBS) (Collect Gold; ICN Biomedicals Inc., Aurora, Ohio), d'antibiotiques (100 U/ml de pénicilline et 100 ug/ml de streptomycine), de 4 mM de glutamine et de 20 mM HEPES (tous trois de Invitrogene). Les cellules HIEC-6 ont été cultivées dans un milieu de culture DMEM (Invitrogene) supplémenté de 5%(v/v) de FBS (Collect Gold; ICN Biomedicals Inc.), d'antibiotiques (100 U/ml de pénicilline et 100 ug/ml de streptomycine), de 4 mM de glutamine, de 20 mM HEPES (tous trois de Invitrogene), de 0.2 U/ml d'insuline (Novo Nordisk Canada Inc., Mississauga, Ont.) et de 5 ng/ml d'EGF (BD Biosciences, Bedford, MA). Les cellules ont été incubées à 37°C sous une atmosphère humide composée de 95% d'air et de 5% de CO₂. Pour les Caco-2/15, le milieu a été changé aux 48 heures jusqu'à l'atteinte des degrés de confluence désirés, soit de 50-70% de confluence (-2 PC), 100% de confluence

(0 PC) et post-confluence (5-30 PC). Pour les HIEC-6, le milieu a été changé aux 48 heures jusqu'à l'atteinte de 100% de confluence.

2. Incubation avec les différents inhibiteurs

Pour l'étude de l'implication des TKs Src dans les mécanismes de régulation de la survie et/ou de l'anoïkose entérocytaires, nous avons utilisé des inhibiteurs pharmacologiques inhibant les TKs Src et Fak (voir Tableau 1). Les différents inhibiteurs ont été ajoutés à du milieu de culture sans sérum (sans EGF ni insuline), préchauffé à 37°C. Les cellules ont été préalablement rincées deux fois avec du milieu de culture sans sérum avant l'ajout du milieu contenant les inhibiteurs. Les traitements ont duré 48 heures.

En plus des inhibiteurs pharmacologiques, les cellules ont été maintenues en suspension pour certaines expériences selon les méthodes établies dans le laboratoire. Ceci inhibait la signalisation intégrines-Fak (Frisch, 1999; Vachon et al., 2002 ; Harnois et al., 2004 ; Dufour et al., 2004). Les HIEC-6 et les Caco-2/15 indifférenciées (-2 PC) ont été réensemencées, suite à une trypsinisation, dans un pétri recouvert de PolyHEMA (Sigma, Oakville, Ont.) (Frisch, 1999; Vachon et al., 2002 ; Harnois et al., 2004 ; Dufour et al., 2004), qui est un polymère non-adhésif, et ceci en présence de milieu sans sérum. Pour les Caco-2/15 différenciées (30 PC), la monocouche, rincée deux fois auparavant avec du milieu sans sérum, a été décollée manuellement à l'aide d'une pipette Pasteur et de milieu sans sérum qui était dirigé en petits jets sous la monocouche pour la faire décoller du fond du pétri (Vachon et al., 2002; Dufour et al., 2004).

2.1 Inhibiteurs pharmacologiques utilisés

Le PP2 (Calbiochem, San Diego, Ca) (Laprise et al., 2002; Thamilselvan et al., 2004), un inhibiteur de l'activité kinase des TKs Src, a été utilisé à une concentration de 20µM suite à une courbe dose-réponse (5-20µM) qui a permis de déterminer la concentration de travail minimale pour qu'il y ait induction d'apoptose (Tableau 1). Nous avons également utilisé l'herbimycine A (Calbiochem) (Park et al., 1991; Laprise et al., 2002), un autre inhibiteur de l'activité kinase des TKs Src, a été utilisée à une concentration de 10µM suite à une courbe dose-réponse (1-10µM) qui a permis de déterminer la concentration de travail minimale pour qu'il y ait induction d'apoptose (Tableau 1). La cytochalasine D (Sigma, Oakville, Ont.) (Lipfert et al., 1992 ; Barberis et al., 2000 ; Gauthier et al., 2001; Vachon et al., 2002 ; Harnois et al., 2004 ; Dufour et al., 2004), à une concentration de 1µM (Tableau 1), est connue pour inhiber l'activation de Fak sans affecter la polymérisation de l'actine et l'intégrité du cytosquelette de la cellule. De plus, la génistéine (Sigma) (Anderson, 1997; Gauthier et al., 2001), un inhibiteur à large spectre de l'activité tyrosine kinase a été utilisée à une concentration de 300µM (Tableau 1).

Tableau 1. Inhibiteurs pharmacologiques utilisés

Inhibiteurs	Enzymes inhibées	Concentrations utilisées	Concentration de travail	Source
PP2	TKs Src	5-20µM	20µM	Calbiochem
Herbimycine A	TKs Src	1-10µM	10µM	Calbiochem
Cytochalasine D	Fak	1µM	1µM	Sigma
Génistéine	TKs	300µM	300µM	Sigma

3. Mise en évidence de l'apoptose par ISEL

Le ISEL, ou TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP mediated nick end labelling) *in situ*, est une technique permettant la détection de la dégradation de l'ADN internucléosomique au sein des cellules individuelles. La technique consiste à marquer l'extrémité 3'-OH des fragments d'ADN avec un nucléotide, le dUTP, couplé à la dioxigénine. Le nucléotide est ajouté par une réaction enzymatique catalysée par la « terminal deoxynucleotidyl transferase » (TdT). Le marquage des fragments d'ADN est visualisé au microscope à fluorescence par l'utilisation d'un anticorps anti-dioxigénine provenant du « ApopTag fluorescein *in situ* Apoptosis detection kit » (Chemicon International Inc., Temecula, CA) couplé à la fluorescéine isothiocyanate (FITC). L'ISEL a été effectué selon une version modifiée (Gauthier et al., 2001; Vachon et al., 2002 ; Harnois et al., 2004 ; Dufour et al., 2004) du protocole fourni avec le « ApopTag fluorescein *in situ* Apoptosis detection kit » (Chemicon International Inc). Pour cette expérience, les cellules ont été cultivées et traitées sur des lamelles de verre de 12 millimètres (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ). Les cellules ont d'abord été lavées deux fois avec du tampon phosphate salin (PBS) 1X (137 mM NaCl (Fisher), 2.7 mM KCl (Sigma), 1.5 mM KH₂PO₄ (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ) et 5.2 mM Na₂HPO₄ (J.T Baker)) froid à pH 7.4. Les cellules ont été fixées dans une solution de 2%(v/v) formaldéhyde (Sigma) dissout dans du tampon phosphate (0.2 M Na₂HPO₄ (J.T Baker) à pH 7.4) pendant 45 min à 4°C. Les lamelles ont ensuite été lavées deux fois avec du PBS 1X pendant 5 min. Les groupes aldéhydes libres ont été neutralisés (« quenchés ») par l'ajout d'une solution de 150 mM glycine (Roche, Mannheim, Germany)/PBS 1X à un

pH 7.2 pendant 15 min à T°P. Ceci a été suivi de 2 lavages au PBS 1X pendant 5 min chacun. Les cellules ont ensuite été perméabilisées avec une solution fraîche de 0.1%(v/v) Triton-X-100 (Roche)/PBS 1X pendant 3 min à T°P, puis lavées 2 fois au PBS 1X (5 min par lavage). Les sites non spécifiques ont été bloqués pendant 5 min à T°P avec une solution de 10%(m/v) de lait écrémé en poudre (Carnation; Nestlé, North York, Ont.)/PBS 1X contenant 0.05%(m/v) d'azide de sodium (Sigma). Cette solution avait été précédemment centrifugée à 10 000 rpm (Micromax; International Equipment Company (IEC), Needham Height, MA) pendant 5 min à T°P pour la débarrasser des particules non-dissoutes. Le tampon d'équilibration a été appliqué pour 5 min à T°P. Il y a ensuite eu dépôt de la solution enzymatique (dilution 1:1,4 de TdT:tampon de réaction) qui avait été préalablement chauffée à 37°C. La réaction enzymatique a duré 1 heure à 37°C et fut terminée par une incubation avec le tampon d'arrêt (dilution 1:34 de tampon d'arrêt:eau) pendant 10 min à T°P. Les lamelles ont été lavées deux fois avec du PBS 1X pendant 5 min, puis bloquées pendant 15 min à T°P avec la solution de blocage précédemment décrite. Les lamelles ont ensuite été incubées avec l'anticorps anti-dioxigénine couplée à la fluorescéine (dilution 1:1,13 d'anticorps:solution de blocage) dans une chambre humide pendant 45 min à T°P. Les lamelles ont été lavées 2 fois avec du PBS 1X, puis les cellules ont été colorées avec une solution de 0.01% de bleu d'Evan (Sigma)/PBS 1X pendant 30 secondes ou avec une solution de DAPI (Sigma)/PBS 1X (dilution 1/50 000 d'une solution stock de DAPI de 10 mg/ml) pendant 5 min. Deux derniers lavages de 10 min avec du PBS 1X ont eu lieu. Finalement, les lamelles ont été montées sur lames (Fisher Scientific) avec une solution de glycérol/PBS 1X (dilution 9:1 de glycérol:PBS 1X) contenant 0.1% de paraphénylène-diamine (Sigma), puis observées à l'aide d'un

microscope Leica DM-RxA (Leica, St-Laurent, Qc). Le logiciel Metamorph Offline version 6.1r5 (Universal Imaging Corporation, Downingtown, PA) a servi à l'analyse d'images dont la prise des micrographies et les comptes cellulaires. Les indices apoptotiques (% d'apoptose) ont été exprimés en tant que proportion de cellules apoptotiques (ISEL-positives) sur le nombre total de cellules comptées ($n \geq 300$ cellules) $\times 100\%$. Les indices apoptotiques des cellules traitées ont ensuite été comparés avec ceux des cellules contrôles respectifs $\times 100\%$, permettant ainsi d'établir les index apoptotiques relatifs (exprimés en % du contrôle). Les indices apoptotiques des cellules contrôles ont été fixés à 100% du contrôle.

4. Analyses par immunoprécipitation et immunobuvardage (Western blot)

4.1 Préparation des échantillons pour Western Blot

Après le retrait du milieu de culture, les cellules (pétri de 100 mm) ont été lavées à deux reprises avec du PBS 1X, puis lysées dans du tampon de solubilisation Laemmli (56.25 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2.3%(m/v) de SDS (J.T. Baker), 10%(v/v) de glycérol (J.T. Baker), 0.005%(m/v) de bleu de bromophénol (J.T. Baker) et 5%(v/v) de β -mercaptoéthanol (Bio-Rad, Hercules, CA)). Les volumes de tampon de solubilisation variaient selon le type cellulaire et le stade de différenciation. Pour les HIEC-6, deux pétris étaient combinés ensemble et chacun contenait 250 μ l de tampon de lyse. Les Caco-2/15 sous-confluentes (-2 PC) étaient aussi combinées par deux pétris, mais chacun contenait 350 μ l de tampon de lyse. Les Caco-2/15 confluentes (0-30 PC) n'étaient pas

combinées et le volume de lyse était de 700µl par pétri. Les échantillons ont été récupérés dans un microtube sur glace, passés aux ultrasons (Ultrasonic processor; Mandel Scientific, St-Laurent, Qc) pendant 10 secondes, puis chauffés à 100°C (Standard Heatblock; VWR Scientifics Products, Ville Mont-Royal, Qc) pendant 5 min. Finalement, les débris cellulaires, contenant la matière insoluble, ont été éliminés par une centrifugation de 5 min à 15 000 rpm (microcentrifugeuse Micromax ; IEC) à T°P. Les surnageants ont été conservés à -80°C.

4.2 Électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE)

Suite au dosage protéique effectué selon la méthode modifiée de Lowry (Peterson, 1977), 50 µg de protéines des échantillons lysés pour Western blot ont été prélevés des échantillons respectifs. Ils ont été chauffés à 100°C durant 5 min et centrifugés avant d'être séparés sur un gel de polyacrylamide dénaturant de 4-15, 7.5 ou 15% (Ready gel Tris; Bio-Rad). Un marqueur de poids moléculaire a été déposé sur le gel (Prestained SDS-PAGE Standards, Broad Range; Bio-Rad ou Full range Rainbow; Amersham Biosciences, Little Chalfont, Angleterre). L'électrophorèse, conformément à la méthode du laboratoire (Gauthier et al., 2001; Vachon et al., 2002 ; Harnois et al., 2004 ; Dufour et al., 2004), a débuté par une pré-migration de 15 min à 70 volts et s'est poursuivie à 100 volts dans un tampon composé de 25 mM Tris (Bio-Rad), 0.1% SDS (J.T. Baker) et 192 mM glycine (Roche). Lorsque la migration a été complétée, les protéines ont été soumises à un électrotransfert liquide (100 volts, 1 heure) sur une membrane de nitrocellulose (Hybond-ECL; Amersham Biosciences) pré-incubée dans le tampon de

transfert (25 mM Tris (Bio-Rad), 192 mM glycine (Roche) et 20% méthanol (VWR Canlab)). L'efficacité du transfert a été vérifiée par la coloration de la membrane au rouge de Ponceau (Sigma) 0.2%/TCA 20%. La membrane a été décolorée en utilisant d'abord de l'eau bidistillée, suivi de PBS 1X.

4.3 Immunodétection des protéines (Western Blot)

L'immunodétection a été effectuée selon la méthode décrite par Gauthier et al.(2001). Brièvement, les membranes sont saturées (blocage) dans une solution de lait écrémé en poudre 10% (blotto) ou dans une solution de BSA 2%, dissous tous les deux dans du PBS 1X/Tween-20 (Bio-Rad) 0.05%, 0.05% d'azide de sodium (Sigma). L'incubation a duré toute la nuit (O/N) à T°P. Le choix de la solution bloquante dépendait de la solution bloquante dans laquelle l'anticorps primaire était dilué. Les membranes ont ensuite été incubées selon les conditions établies pour chacun des anticorps primaires utilisés (voir Tableau 2 et Section 4.6.1). Ces incubations se sont déroulées à 4°C pour la nuit ou à T°P pour des périodes variant de 1 à 2 heures. Ensuite, les membranes ont été soumises à 4 lavages de 10 min sous agitation dans une solution de PBS/Tween-20 0.05% (PBS/T). Cette étape a été suivie d'une incubation de 1 heure à T°P dans une solution de blotto 10%-PBS/Tween-20 0.05% ne contenant toutefois pas d'azide de sodium. Les membranes ont ensuite été lavées 2 fois sous agitation durant 5 min dans une solution de PBS/Tween-20 0.05%. Par la suite, les membranes ont été incubées 1 heure à T°P avec la solution d'anticorps secondaire couplé à une peroxydase (voir section 4.6.2) et diluée dans le blotto 10%-PBS/Tween-20 0.05% ne contenant pas d'azide de sodium. Les

membranes ont été lavées sous agitation 2 fois avec la solution de PBS/Tween-20 0.05% et 2 fois avec du PBS 1X seul, pour des périodes de 10 min à chaque lavage. Les bandes immunoréactives ont été révélées par l'ajout de la solution ECL (Amersham Biosciences) pendant une minute, suivi d'une exposition des films « Hyper Film ECL » (Amersham Biosciences) variant entre 2 secondes et 30 minutes.

4.4 Préparation des échantillons pour immunoprécipitation

Après le retrait du milieu de culture, les cellules (pétri de 100 mm) ont été lavées à deux reprises avec du PBS 1X froid, puis lysées dans du tampon de solubilisation RIPA (50 mM Tris-HCl pH 7.2, 150 mM NaCl (Fisher), 1 mM DTT (Sigma), 0.5 mM EDTA (Sigma), 1% Nonidet P-40 (Roche), 0.5% Déoxicholate de sodium (Sigma), 0.1% SDS (J.T. Baker), 100 μ M othovanadate de sodium (Sigma), 1mM PMSF (Sigma)/Isopropanol (Sigma), 0.5 μ g/ml de Leupeptine (Sigma), 0.5 μ g/ml d'Aprotinine (Sigma), 0.7 μ g/ml de Pestatine (Sigma), 40 mM de β -Glycérophosphate (Sigma) et 10 mM de p-NPP (Sigma)). Les cellules HIEC-6 et Caco-2/15 sous-confluentes (-2 PC) étaient lysées dans 250 μ l par pétri et pouvaient être combinées pour totaliser 500 μ l ou 1 ml. Pour les cellules Caco-2/15 confluentes (0-30 PC), elles étaient lysées dans 1 ml. Les échantillons ont été récupérés dans un microtube, puis lysés sur glace pendant 30 min en vortexant aux 5 min. Les débris cellulaires, contenant la matière insoluble, ont été éliminés par une centrifugation de 5 min à 15 000 rpm (microfugeuse Micromax ; Thermo IEC) à 4°C. Les surnageants ont été conservés à -80°C.

4.5 Immunoprécipitation (et co-immunoprécipitation)

L'immunoprécipitation est effectuée tel que décrit par Gauthier et al. (2001). Brièvement, les billes d'agarose déjà couplées à de la protéine-A (Sigma) ou à de la protéine-G (Sigma) ont été lavées afin de les débarrasser du tampon salin dans lequel elles étaient contenues. 50 µl de billes ont été utilisés par échantillon. Les billes ont été lavées 3 fois avec 500 µl de tampon RIPA non complet (50 mM Tris-HCl pH 7.2, 150 mM NaCl (Fisher), 1 mM DTT (Sigma), 0.5 mM EDTA (Sigma), 1% Nonidet P-40 (Roche), 0.5% déoxycholate de sodium (Sigma) et 0.1% SDS (J.T. Baker)). Pour le reste de l'expérience, il faut noter que le tampon RIPA était complet, i.e. qu'il contenait les composants de base (décrites ci-haut) et le cocktail d'inhibiteurs (100 µM orthovanadate de sodium (Sigma), 1mM PMSF (Sigma)/Isopropanol (Sigma), 0.5 µg/ml de Leupeptine (Sigma), 0.5 µg/ml d'Aprotinine (Sigma), 0.7 µg/ml de Pestatine (Sigma), 40 mM de β-Glycérophosphate (Sigma) et 10 mM de p-NPP (Sigma)). Suite aux lavages, il y a eu liaison de l'anticorps reconnaissant la protéine d'intérêt avec les billes. À 300 µl de tampon RIPA, nous avons ajouté la quantité d'anticorps recommandée par le fabricant pour l'immunoprécipitation. Les échantillons ont alors été agités pendant 2 heures à T°P (Gyrotwister Shaker GX-1000 ; Labnet International Inc., Woodbridge, NJ). Les microtubes ont ensuite été centrifugés à 15 000 rpm à T°P, et les billes lavées 2 fois avec 300 µl de tampon RIPA. Le complexe billes-anticorps a ensuite été mis en contact avec 500 µl ou 1 ml de lysat pour chaque échantillon. Les microtubes ont été mis sous agitation à 4°C pendant 4 heures. Les microtubes ont ensuite été centrifugés à 15 000 rpm à 4°C, puis les lysats récupérés pour conservation (-80°C). Les immunoprécipitats ont été

lavés 3 fois avec du tampon RIPA, puis solubilisés dans 100 µl de tampon Laemmli par chauffage (5 min. à 100°C). Les microtubes ont ensuite été centrifugés à 15 000 rpm à T°P pendant 5 min, puis conservés à -80°C. Les immunoprécipitats ont par la suite été résolus par SDS-PAGE et analysés par Western blot (voir Sections 4.2 et 4.3) afin de : A) détecter la forme active de la kinase, B) détecter la quantité totale de kinase immunoprécipitée ou C) vérifier s'il y avait co-immunoprécipitation des kinases d'intérêt avec Fak dans les immunoprécipitats de Fak.

4.6 Anticorps utilisés

4.6.1 Anticorps primaires utilisés

A) Anticorps polyclonaux produits chez le lapin (voir Tableau 2)

Nous avons utilisé des anticorps polyclonaux dirigés contre la kinase p62^{Yes} (Ab 06-514, Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY), la kinase p59^{Fyn} (Ab 06-133, Upstate Biotechnology) et la forme active de Fak (Phospho-Fak (Tyr397)) (Ab 07-012, Upstate Biotechnology).

B) Anticorps monoclonaux produits chez la souris (voir Tableau 2).

Nous avons utilisé les anticorps monoclonaux suivants : mAb 327 (Lipsich et al., 1983; Laprise et al., 2002), dirigé contre la kinase p60^{Src}, gracieusement donné par Dr. J.S. Brugge (Harvard Medical School, Boston, MA) ; mAb GD11 (Ab 05-184, Upstate

Biotechnology) dirigé également contre p60^{Src}; mAb 9A6 (Ab 05-677, Upstate Biotechnology) dirigé contre la forme active de Src (Phospho-Src (Tyr416)) ; mAb 4.47 (Ab 05-537, Upstate Biotechnology) dirigé contre la kinase p125^{Fak}; mAb PY99 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) dirigé contre les phosphotyrosines et mAb 1501 (Chemicon) dirigé contre l'actine.

Tableau 2. Anticorps primaires utilisés pour les analyses en Western blot

Anticorps	Protéine reconnue	Type/espèce	Dilution	Incubation	Source
Ab 06-133	p59 ^{Fyn}	Polyclonal/lapin	1/500 Blotto 10%-PBS/T	O/N 4°C	Upstate Biotechnology
Ab 06-514	p62 ^{Yes}	Polyclonal/lapin	1/750 Blotto 10%-PBS/T	O/N 4°C	Upstate Biotechnology
Ab 07-012	pp125 ^{Fak} (Tyr397)	Polyclonal/lapin	1/1500 BSA 2%-PBS/T	2h T°P	Upstate Biotechnology
mAb GD11 /Ab 05-184	p60 ^{Src}	Monoclonal/souris	1/500 Blotto 10%-PBS/T	O/N 4°C	Upstate Biotechnology
mAb 4.47 /Ab 05-537	p125 ^{Fak}	Monoclonal/souris	1/1000 Blotto 10%-PBS/T	2h T°P	Upstate Biotechnology
mAb 9A6 /Ab 05-677	pp60 ^{Src} (Tyr416)	Monoclonal/souris	1/500 BSA 2%-PBS/T	O/N 4°C	Upstate Biotechnology
mAb 327	p60 ^{Src}	Monoclonal/souris	1/500 Blotto 10%-PBS/T	O/N 4°C	J.S. Brugge
mAb 1501	Actine	Monoclonal/souris	1/10000 Blotto 10%-PBS/T	1h T°P	Chemicon
mAb PY99	Phospho-tyrosine	Monoclonal/souris	1/250 BSA 2%-PBS/T	2h T°P	Santa Cruz

4.6.2 Anticorps secondaires utilisés

Nous avons utilisé des anticorps secondaires couplés à la peroxydase dirigés contre les IgG de lapin (Ab 7074, Cell Signaling, Beverly MA) ou contre les IgG de souris (A-

2554, Sigma). Dans tous les cas, les anticorps secondaires étaient dilués 1/1500 dans une solution de blotto 10%-PBS/Tween-20 0.05% sans azide de sodium.

4.7 Déshybridation des membranes

Pour certaines expériences d'analyse en Western Blot, les membranes ont été déshybridées, suite à une première utilisation, par une incubation de 20 min à T°P dans une solution de 100 mM glycine (Roche), 1% Tween-20 (Bio-Rad) (pH 2.9). Par la suite, les membranes ont été lavées 3 fois durant 5 min avec du PBS 1X. Le Western Blot subséquent a débuté par l'étape du blocage (précédant l'incubation avec l'anticorps primaire).

4.8 Analyses densitométriques

Les bandes ont été quantifiées par densitométrie. Les films ont d'abord été numérisés (Epson perfection 1660 Photo ; Epson, Long Beach, CA). La densitométrie des bandes a été analysée grâce au programme Scion Image (Scion Corporation, Frederick, MD). L'aire sous la courbe a été évaluée pour chaque bande. Pour déterminer les niveaux relatifs d'expression des protéines, nous avons utilisé l'actine comme protéine référence et celle-ci nous a permis d'établir les ratios $p60^{Src}/actine$, $p59^{Fyn}/actine$ et $p62^{Yes}/actine$ qui sont des valeurs relatives des niveaux d'expression. Pour les niveaux relatifs d'activation, les ratios établis étaient sous la forme de kinase tyrosine phosphorylée (ptyr)/quantité totale de kinase immunoprécipitée. Nous avons donc obtenus les ratios

suivants : $\text{ptyr} \text{p60}^{\text{Src}} / \text{p60}^{\text{Src}}$ ou $\text{ptyr}^{416} \text{p60}^{\text{Src}} / \text{p60}^{\text{Src}}$, $\text{ptyr} \text{p59}^{\text{Fyn}} / \text{p59}^{\text{Fyn}}$, $\text{ptyr} \text{p62}^{\text{Yes}} / \text{p62}^{\text{Yes}}$ et $\text{ptyr}^{397} \text{p125}^{\text{Fak}} / \text{p125}^{\text{Fak}}$. Pour les niveaux relatifs de co-immunoprécipitation, nous avons utilisé la quantité totale de Fak immunoprécipitée comme référence. Celle-ci a permis d'obtenir les ratios $\text{p60}^{\text{Src}} / \text{p125}^{\text{Fak}}$, $\text{p59}^{\text{Fyn}} / \text{p125}^{\text{Fak}}$ et $\text{p62}^{\text{Yes}} / \text{p125}^{\text{Fak}}$. Lors de l'utilisation de traitements, les niveaux relatifs d'activation et de co-immunoprécipitation des protéines analysées ont été comparés avec ceux des cellules contrôles respectifs afin d'établir le ratio traitement/contrôle x 100%. Les niveaux relatifs d'activation et de co-immunoprécipitation étaient alors exprimés comme le « % du contrôle ».

5. Analyses statistiques

Les données et résultats présentés ici constituent la moyenne \pm SEM de 3 expériences, i.e. 3 séries d'échantillons distincts ($n \geq 3$). L'erreur sur les valeurs est l'erreur standard sur la moyenne ou SEM (« Standard Error on Mean »). Les différences statistiquement significatives du contrôle ont été obtenues pour un intervalle de confiance de 95% ($0.001 \leq p \leq 0.05$) grâce au test statistique de Student fait avec le programme Sigma Stat (SPSS Inc., Chicago, IL).

III – RÉSULTATS

1. Les niveaux relatifs d'expression des tyrosine kinases membres de la famille Src (TKs Src) varient au cours du processus de différenciation des cellules épithéliales intestinales.

Afin de vérifier s'il y a des distinctions chez les cellules épithéliales intestinales entre les trois TKs Src d'intérêt (i.e. Src, Fyn et Yes), nous avons d'abord étudié leur expression selon l'état de différenciation. Spécifiquement, nous avons analysé l'expression des TKs Src chez des cellules indifférenciées (Caco-2/15 à -2 PC), en cours de différenciation (Caco-2/15 à 0, 5, 10 et 20 PC) et pleinement différenciées (Caco-2/15 à 30 PC) en procédant par immunobuvardage. En comparant leur expression respective avec celle de l'actine, ceci nous a permis d'établir les niveaux relatifs d'expression selon l'état de différenciation. De plus, nous avons utilisé la lignée cellulaire HIEC à titre de comparaison, puisque les HIEC, bien que cryptales, elles sont des cellules indifférenciées normales, contrairement aux Caco-2/15 qui sont d'origine cancéreuse et côloniques.

La première TK Src étudiée a été Src (p60^{Src}). Comme nous pouvons le remarquer à la Figure 10, l'expression de Src est très faible chez les Caco-2/15 indifférenciées (-2 PC) et quasi absente chez les HIEC (Figure 10A, puits 1 et 2; Figure 10B). Toutefois, nous notons une hausse graduelle de l'expression de Src dès l'atteinte de la confluence (Figure 10A, puits 3 à 6; Figure 10B). Celle-ci semble se stabiliser vers la fin du processus, puisque l'expression de Src à 20 PC est similaire à celle des cellules pleinement

différenciées à 30 PC (Figure 10A, puits 6 et 7; Figure 10B). Ainsi, l'expression de Src chez les cellules indifférenciées est différente significativement de celle retrouvée chez les cellules différenciées (Figure 10B). Nous notons aussi une différence significative des niveaux d'expression de Src entre les cellules Caco-2/15 indifférenciées et les HIEC (Figure 10B).

La deuxième TK Src à laquelle nous nous sommes intéressés fut Fyn ($p59^{Fyn}$). Pour commencer, l'étude de son expression a permis de remarquer qu'il y a deux isoformes présentes chez les cellules intestinales, soit une forme à 59 kDa ($p59^{Fyn}$) et une deuxième à 62 kDa ($p62^{Fyn}$) (Figure 11A) (Pour de plus amples renseignements sur la forme à 62 kDa, voir Danielan, 1993). Toutefois pour la présente étude, nous nous intéresserons seulement à la forme de 59 kDa qui est prédominante. Lorsque nous regardons plus attentivement l'expression de Fyn, nous notons qu'elle est faible avant la confluence des cellules (Figure 11A, puits 2; Figure 11B). Lorsque les cellules entament leur processus de différenciation, il y a augmentation des niveaux relatifs d'expression et ceux-ci atteignent un maximum à 10 jours post-confluence. Ensuite, ils diminuent quelque peu, sans toutefois atteindre les niveaux relatifs d'expression retrouvés chez les cellules indifférenciées (Figure 11A, puits 3 à 7; Figure 11B). La différence entre les deux états de différenciation n'est d'ailleurs pas significative (Figure 11B). Comme pour Src, le niveau relatif d'expression de Fyn est très faible chez les HIEC et il est différent significativement de celui des Caco-2/15 indifférenciées (Figure 11A, puits 1; Figure 11B).

Figure 10. *Expression de p60^{Src} au cours du processus de différenciation des cellules épithéliales intestinales humaines.* (A) Analyses en Western blot représentatives de l'expression de la kinase p60^{Src} chez les cellules HIEC-6 (puits 1) et les Caco-2/15 (puits 2 à 7) à divers stades de différenciation : -2 PC (sous-confluentes; indifférenciées) (puits 2), 0 PC (confluentes) (puits 3), 5 PC (puits 4), 10 PC (puits 5), 20 PC (puits 6) et 30 PC (différenciées) (puits 7). Les cellules ont été cultivées en présence de 5% de FBS pour les HIEC-6 et de 10% de FBS pour les Caco-2/15. Lors de l'atteinte de confluence désirée, les cellules ont été lysées dans du tampon Laemmli. Les lysats totaux de protéines (50µg/puits) ont été séparés par électrophorèse sur gel SDS-PAGE 4-15% sous des conditions réductrices, électrotransférés sur membrane de nitrocellulose et immunodétectés avec un anticorps spécifique pour la détection de p60^{Src}. La détection de l'actine a été effectuée afin de normaliser la quantité de protéines dans chacun des puits. (B) Les bandes de protéines ont été numérisées, puis les niveaux d'expression des protéines ont été évalués par rapport aux niveaux d'actine en utilisant le logiciel Scion Image pour établir le ratio p60^{Src}/actine. Les points reliés par la courbe représentent la moyenne \pm SEM (« standard error of the mean ») pour chaque stade de différenciation pour au moins 3 expériences distinctes ($n \geq 3$). Les différences significatives ($0,001 \leq p \leq 0,05$) entre les cellules Caco-2/15 indifférenciées (-2 PC) et les cellules Caco-2/15 différenciées (30 PC) sont indiquées par un astérisque (*) et celles entre les HIEC et les cellules Caco-2/15 indifférenciées (-2 PC) sont indiquées par deux astérisques (**).

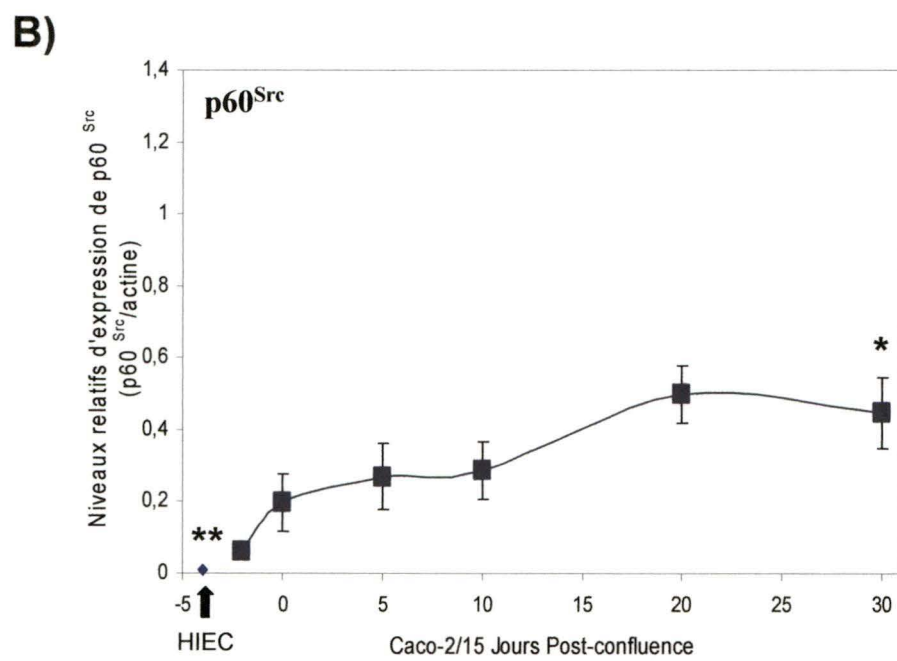
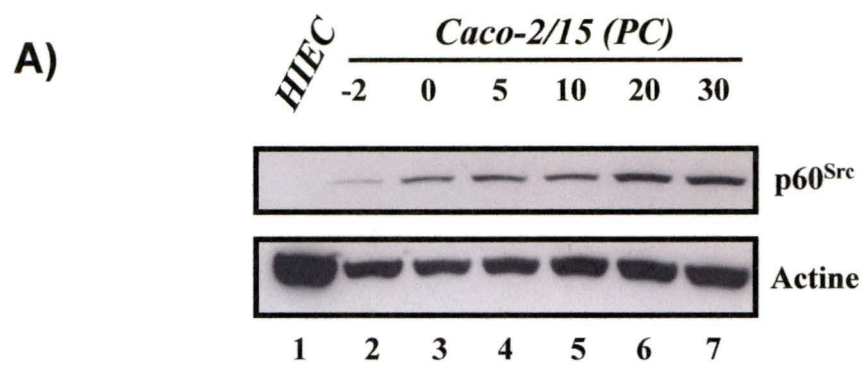
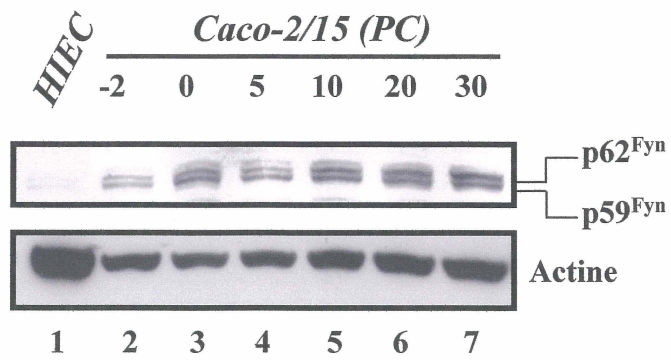


Figure 11. *Expression de p59^{Fyn} au cours du processus de différenciation des cellules épithéliales intestinales humaines.* (A) Analyses en Western blot représentatives de l'expression de la kinase p59^{Fyn} chez les cellules HIEC-6 (puits 1) et les Caco-2/15 (puits 2 à 7) à divers stades de différenciation : -2 PC (sous-confluentes; indifférenciées) (puits 2), 0 PC (confluentes) (puits 3), 5 PC (puits 4), 10 PC (puits 5), 20 PC (puits 6) et 30 PC (différenciées) (puits 7). Les cellules ont été cultivées en présence de 5% de FBS pour les HIEC-6 et de 10% de FBS pour les Caco-2/15. Lors de l'atteinte de confluence désirée, les cellules ont été lysées dans du tampon Laemmli. Les lysats totaux de protéines (50µg/puits) ont été séparés par électrophorèse sur gel SDS-PAGE 4-15% sous des conditions réductrices, électrotransférés sur membrane de nitrocellulose et immunodétectés avec un anticorps spécifique pour la détection de p59^{Fyn}. La détection de l'actine a été effectuée afin de normaliser la quantité de protéines dans chacun des puits.

(B) Les bandes de protéines ont été numérisées et une section de la bande à 59 kDa a été sélectionnée (et non la bande totale). Les niveaux d'expression des protéines ont été évalués par rapport aux niveaux d'actine en utilisant le logiciel Scion Image pour établir le ratio p59^{Fyn}/actine. Les points reliés par la courbe représentent la moyenne \pm SEM (« standard error of the mean ») pour chaque stade de différenciation pour au moins 3 expériences distinctes ($n \geq 3$). Les différences significatives ($0,001 \leq p \leq 0,05$) entre les cellules Caco-2/15 indifférenciées (-2 PC) et les cellules HIEC sont indiquées par deux astérisque (**).

A)



B)

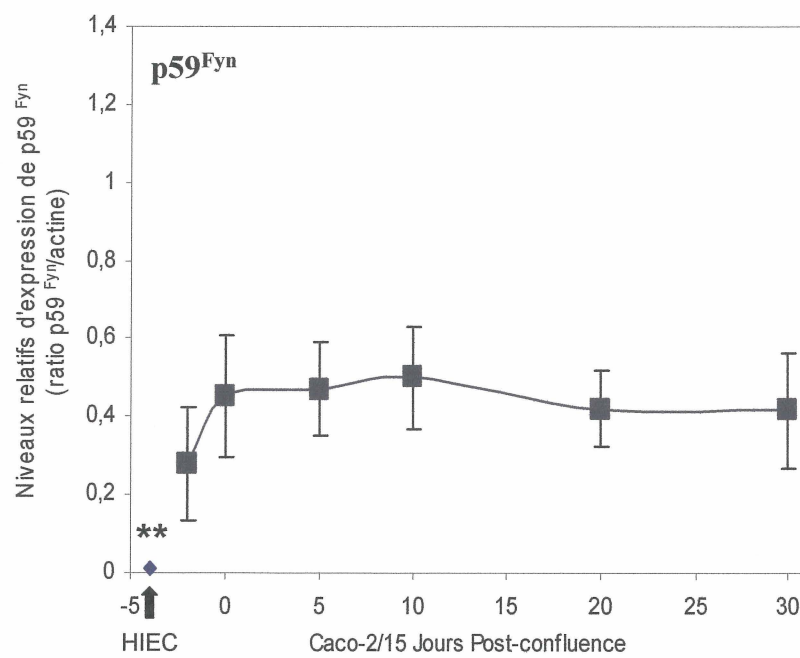
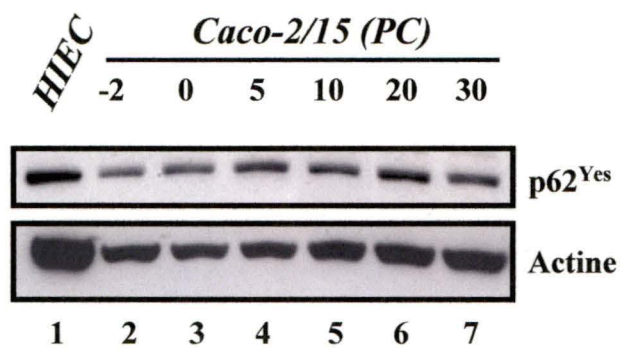
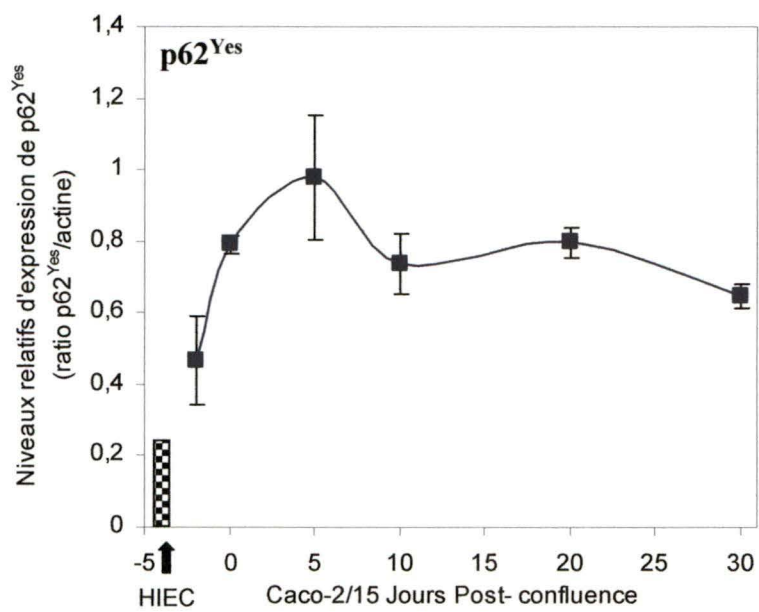


Figure 12. *Expression de p62^{Yes} au cours du processus de différenciation des cellules épithéliales intestinales humaines.* (A) Analyses en Western blot représentatives de l'expression de la kinase p62^{Yes} chez les cellules HIEC-6 (puits 1) et les Caco-2/15 (puits 2 à 7) à divers stades de différenciation : -2 PC (sous-confluentes; indifférenciées) (puits 2), 0 PC (confluentes) (puits 3), 5 PC (puits 4), 10 PC (puits 5), 20 PC (puits 6) et 30 PC (différenciées) (puits 7). Les cellules ont été cultivées en présence de 5% de FBS pour les HIEC-6 et de 10% de FBS pour les Caco-2/15. Lors de l'atteinte de confluence désirée, les cellules ont été lysées dans du tampon Laemmli. Les lysats totaux de protéines (50µg/puits) ont été séparés par électrophorèse sur gel SDS-PAGE 4-15% sous des conditions réductrices, électrotransférés sur membrane de nitrocellulose et immunodétectés avec un anticorps spécifique pour la détection de p62^{Yes}. La détection de l'actine a été effectuée afin de normaliser la quantité de protéines dans chacun des puits. (B) Les bandes de protéines ont été numérisées, puis les niveaux d'expression des protéines ont été évalués par rapport aux niveaux d'actine en utilisant le logiciel Scion Image pour établir le ratio p62^{Yes}/actine. Les points reliés par la courbe représentent la moyenne \pm SEM (« standard error of the mean ») pour chaque stade de différenciation pour au moins 3 expériences distinctes (n \geq 3).

A)



B)



La dernière TK Src dont nous avons analysé les niveaux relatifs d'expression a été Yes (p62^{Yes}). Tout d'abord, ses niveaux relatifs d'expression augmentent jusqu'après la confluence pour atteindre un maximum à 5 PC (Figure 12A, puits 1 à 4; Figure 12B). Jusqu'à la différenciation terminale (30 PC), les niveaux relatifs d'expression de Yes sont ensuite inférieurs (Figure 12A, puits 5 à 7; Figure 12B). Bien qu'il y ait une tendance d'un profil d'expression biphasique au cours du processus de différenciation, avec un maximum à 5 PC, la différence d'expression de Yes entre les cellules Caco-2/15 indifférenciées (-2 PC) et celles pleinement différenciées (30 PC) n'est pas significative. Contrairement à l'expression de Src et Fyn chez les HIEC (Figure 10; Figure 11), l'expression de Yes ne diffère pas significativement de celle des cellules Caco-2/15 indifférenciées (Figure 12A, puit 1; Figure 12B).

Ainsi, il y a établissement d'un profil d'expression distinct seulement pour Src au cours du processus de différenciation des cellules épithéliales intestinales. Les deux autres TKs Src ne présentent pas de différences significatives dans leur expression entre l'état indifférencié et celui différencié chez les Caco-2/15. Finalement, l'expression des TKs Src chez les HIEC ne correspond pas à celle retrouvée chez les cellules Caco-2/15 indifférenciées.

2. Les niveaux relatifs d'activation des tyrosine kinases membres de la famille Src (TKs Src) varient au cours du processus de différenciation des cellules épithéliales intestinales.

Suite à l'étude des niveaux relatifs d'expression des trois TKs Src au cours du processus de différenciation, nous nous sommes intéressés à l'état d'activation de celles-ci lors de ce processus. Bien qu'une kinase soit exprimée, encore faut-il qu'elle soit activée pour pouvoir exercer son activité enzymatique. Nous avons analysé l'état d'activation des TKs Src, car il peut être un reflet de l'activité des kinases. Nous avons procédé par l'immunoprécipitation de chaque kinase, suivie d'immunobuvardages. Nous avons détecté la forme activée et la quantité totale de kinase immunoprécipitée. Ceci nous a permis d'établir les niveaux relatifs d'activation basale de chaque TKs Src, car les cellules étaient cultivées en présence de sérum.

Comme nous le remarquons à la Figure 13A, Src est activée tout au long du processus de différenciation. Ses niveaux relatifs d'activation ne subissent toutefois pas de changements majeurs au cours du processus de différenciation des cellules épithéliales intestinales (Figure 13B). En effet, les niveaux relatifs d'activation sont presque les mêmes chez les cellules indifférenciées que chez celles différenciées (Figure 13B). Il y a une très légère hausse, mais qui n'est pas significative. Nous ne pouvons donc pas affirmer qu'il y a établissement d'un profil d'activation significativement distinct de Src au cours de la différenciation. Chez les HIEC, l'activation de Src est plus faible que chez les Caco-2/15 indifférenciées et ce, de façon significative (Figure 13B).

Figure 13. *Activation relative de p60^{Src} au cours du processus de différenciation des cellules épithéliales intestinales humaines.* (A) Analyses en Western blot représentatives de l'activation de la kinase p60^{Src} chez les cellules HIEC-6 (puits 1) et les Caco-2/15 (puits 2 à 5) à divers stades de différenciation : -2 PC (sous-confluentes; indifférenciées) (puits 2), 0 PC (confluentes) (puits 3), 10 PC (puits 4) et 30 PC (différenciées) (puits 5). Les cellules ont été cultivées en présence de 5% de FBS pour les HIEC-6 et de 10% de FBS pour les Caco-2/15. Lors de l'atteinte de confluence désirée, les cellules ont été lysées dans du tampon RIPA et s'en est suivi une immunoprécipitation de p60^{Src}. 15µl d'immunoprécipitat ont été séparés par électrophorèse sur gel SDS-PAGE 15% sous des conditions réductrices, électrotransférés sur membrane de nitrocellulose et immunodétectés avec un anticorps anti-phosphotyrosine pour la détection de la forme activée de p60^{Src} (tyrosine phosphorylée; ^{tyr}p60^{Src}). La détection de la quantité totale de p60^{Src} immunoprécipitée a été effectuée avec l'anticorps ayant servi à l'immunoprécipitation, afin de normaliser la quantité de protéines dans chacun des puits. (B) Les bandes de protéines ont été numérisées, puis les niveaux relatifs d'activation de p60^{Src} ont été évalués en établissant le rapport ^{tyr}p60^{Src}/p60^{Src}, soit la forme activée/quantité totale de kinase immunoprécipitée, en utilisant le logiciel Scion Image. Les points reliés par la courbe représentent la moyenne ± SEM (« standard error of the mean ») pour chaque stade de différenciation pour au moins 3 expériences distinctes (n≥3). Les différences significatives (0,001 ≤ p ≤ 0,05) entre les cellules Caco-2/15 indifférenciées (-2 PC) et les HIEC sont indiquées par deux astérisques (**). (C) Comme en A, sauf que l'immunodétection de la forme activée de Src (^{tyr416}p60^{Src}) a été effectué avec un anticorps spécifique de celle-ci (voir matériel et méthode).

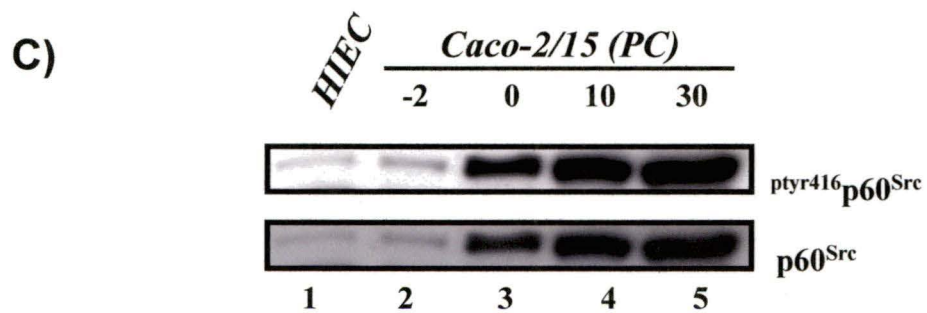
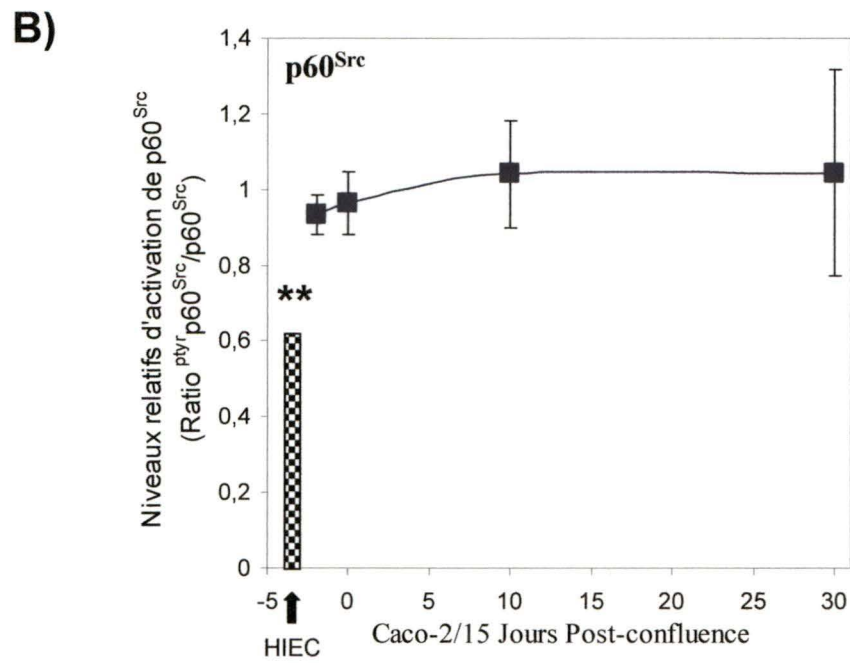
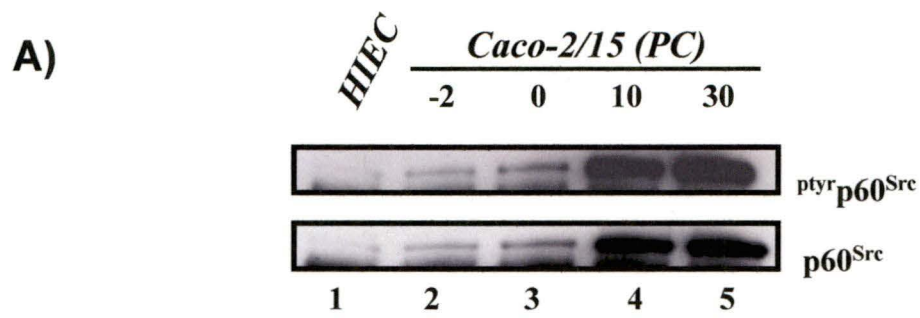


Figure 14. Activation relative de $p59^{Fyn}$ au cours du processus de différenciation des cellules épithéliales intestinales humaines. **(A)** Analyses en Western blot représentatives de l'activation de la kinase $p59^{Fyn}$ chez les cellules HIEC-6 (puits 1) et les Caco-2/15 (puits 2 à 5) à divers stades de différenciation : -2 PC (sous-confluentes; indifférenciées) (puits 2), 0 PC (confluentes) (puits 3), 10 PC (puits 4) et 30 PC (différenciées) (puits 5). Les cellules ont été cultivées en présence de 5% de FBS pour les HIEC-6 et de 10% de FBS pour les Caco-2/15. Lors de l'atteinte de confluence désirée, les cellules ont été lysées dans du tampon RIPA et s'en est suivi une immunoprécipitation de $p59^{Fyn}$. 15µl d'immunoprécipitat ont été séparés par électrophorèse sur gel SDS-PAGE 15% sous des conditions réductrices, électrotransférés sur membrane de nitrocellulose et immunodétectés avec un anticorps anti-phosphotyrosine pour la détection de la forme activée de $p59^{Fyn}$ (tyrosine phosphorylée; $^{ptyr}p59^{Fyn}$). La détection de la quantité totale de $p59^{Fyn}$ immunoprécipitée a été effectuée avec l'anticorps ayant servi à l'immunoprécipitation, afin de normaliser la quantité de protéines dans chacun des puits. **(B)** Les bandes de protéines ont été numérisées, puis les niveaux relatifs d'activation de $p59^{Fyn}$ ont été évalués en établissant le rapport $^{ptyr}p59^{Fyn}/p59^{Fyn}$, soit la forme activée/quantité totale de kinase immunoprécipitée, en utilisant le logiciel Scion Image. Les points reliés par la courbe représentent la moyenne \pm SEM (« standard error of the mean ») pour chaque stade de différenciation pour au moins 3 expériences distinctes ($n \geq 3$). Les différences significatives ($0,001 \leq p \leq 0,05$) entre les cellules Caco-2/15 indifférenciées (-2 PC) et les cellules Caco-2/15 différenciées (30 PC) sont indiquées par un astérisque (*) et celles entre les HIEC et les cellules Caco-2/15 indifférenciées (-2 PC) sont indiquées par deux astérisques (**).

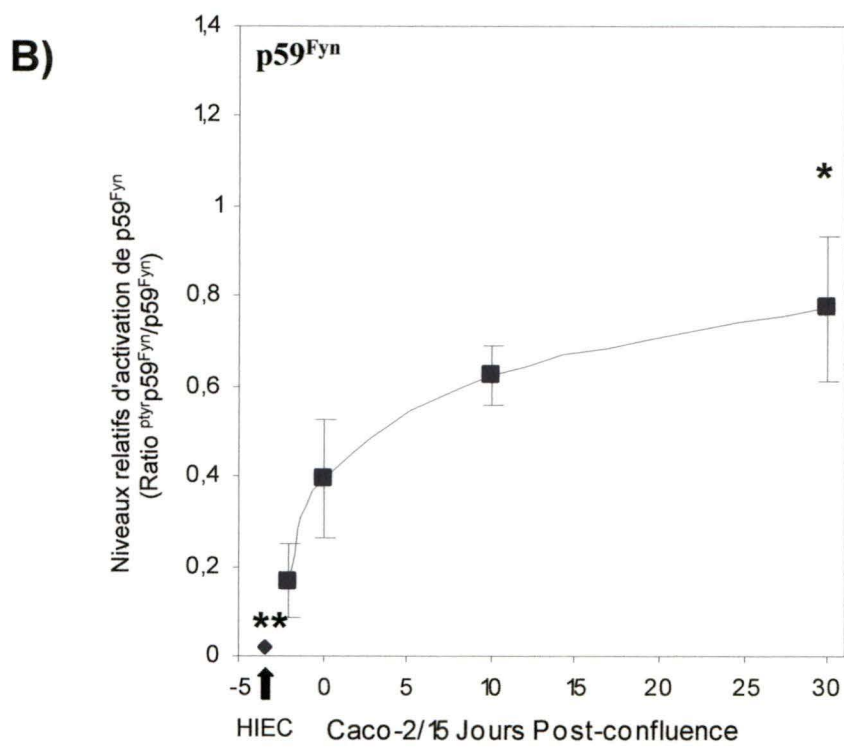
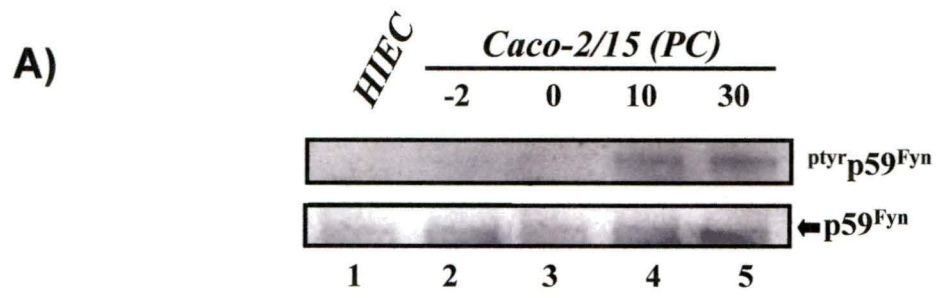
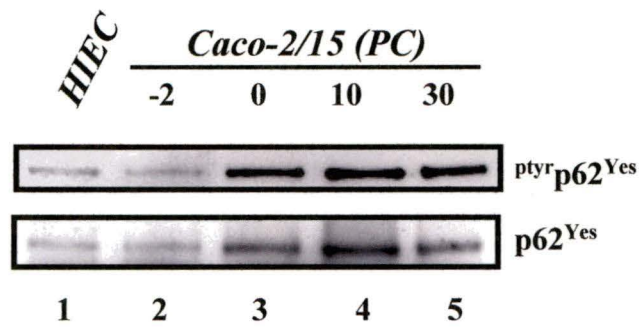


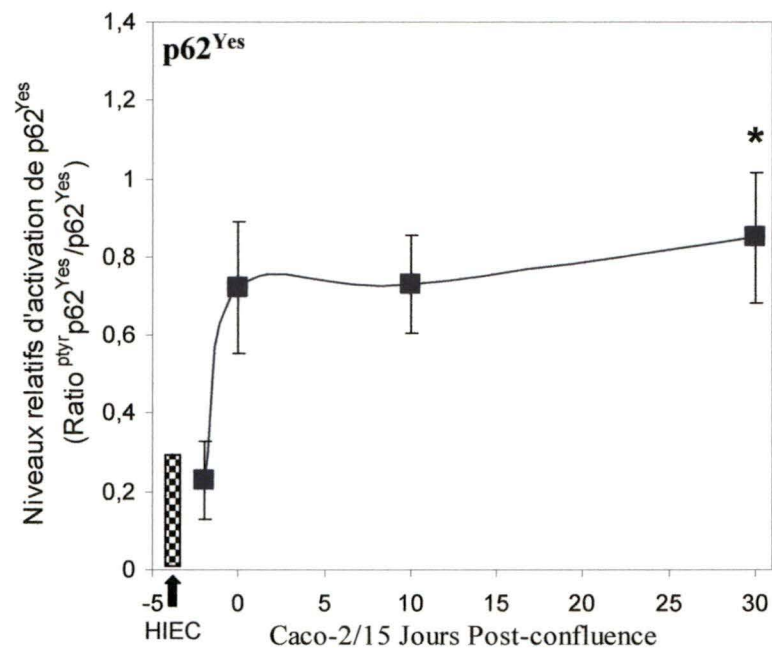
Figure 15. *Activation relative de p62^{Yes} au cours du processus de différenciation des cellules épithéliales intestinales humaines.* (A) Analyses en Western blot représentatives de l'activation de la kinase p62^{Yes} chez les cellules HIEC-6 (puits 1) et les Caco-2/15 (puits 2 à 5) à divers stades de différenciation : -2 PC (sous-confluentes; indifférenciées) (puits 2), 0 PC (confluentes) (puits 3), 10 PC (puits 4) et 30 PC (différenciées) (puits 5). Les cellules ont été cultivées en présence de 5% de FBS pour les HIEC-6 et de 10% de FBS pour les Caco-2/15. Lors de l'atteinte de confluence désirée, les cellules ont été lysées dans du tampon RIPA et s'en est suivi une immunoprécipitation de p62^{Yes}. 15µl d'immunoprécipitat ont été séparés par électrophorèse sur gel SDS-PAGE 15% sous des conditions réductrices, électrotransférés sur membrane de nitrocellulose et immunodétectés avec un anticorps anti-phosphotyrosine pour la détection de la forme activée de p62^{Yes} (tyrosine phosphorylée; ^{ptyr}p62^{Yes}). La détection de la quantité totale de p62^{Yes} immunoprécipitée a été effectuée avec l'anticorps ayant servi à l'immunoprécipitation, afin de normaliser la quantité de protéines dans chacun des puits.

(B) Les bandes de protéines ont été numérisées, puis les niveaux relatifs d'activation de p62^{Yes} ont été évalués en établissant le rapport ^{ptyr}p62^{Yes}/p62^{Yes}, soit la forme activée/quantité totale de kinase immunoprécipitée, en utilisant le logiciel Scion Image. Les points reliés par la courbe représentent la moyenne ± SEM (« standard error of the mean ») pour chaque stade de différenciation pour au moins 3 expériences distinctes (n≥3). Les différences significatives (0,001 ≤ p ≤ 0,05) entre les cellules Caco-2/15 indifférenciées (-2 PC) et les cellules Caco-2/15 différenciées (30 PC) sont indiquées par un astérisque (*) et celles entre les HIEC et les cellules Caco-2/15 indifférenciées (-2 PC) sont indiquées par deux astérisques (**).

A)



B)



Il faut noter que les résultats présentés ici ont été réalisés en utilisant un anticorps anti-phosphotyrosines, car l'anticorps spécifique à la tyrosine responsable de l'activation de Src, soit la tyrosine 416, n'était pas disponible sur le marché lors des analyses. Lorsque l'anticorps reconnaissant spécifiquement la tyrosine 416 de Src fut disponible, nous avons refait les immunobuvardages (voir Figure 13C) et nous avons obtenus le même patron d'activation (non représenté).

Maintenant pour ce qui est de Fyn, nous remarquons que son activation augmente graduellement tout au cours de la différenciation (Figure 14A; Figure 14B). De plus, les niveaux relatifs d'activation basale de Fyn sont différents significativement selon l'état de différenciation des cellules Caco-2/15 (Figure 14B). Pour Fyn, il y a donc établissement d'un profil d'activation relative qui est distinct durant le processus de différenciation. Pour ce qui est de l'activation chez les cellules HIEC, elle est très faible et différente de façon significative de celle retrouvée chez les cellules Caco-2/15 indifférenciées (Figure 14B).

Tout comme Fyn, Yes possède des niveaux relatifs d'activation qui sont différents significativement selon l'état de différenciation des cellules Caco-2/15 (Figure 15B). En effet, ses niveaux d'activation basale sont plus faibles chez les cellules Caco-2/15 indifférenciées que chez les cellules Caco-2/15 différenciées (Figure 15A; Figure 15B). Nous remarquons que l'atteinte de la confluence cause une augmentation des niveaux relatifs d'activation de Yes chez les cellules Caco-2/15 qui est d'ailleurs significative (Figure 15A; Figure 15B). Par la suite, les niveaux relatifs d'activation de Yes restent

sensiblement constants (Figure 15A; Figure 15B). Ainsi la différence est significative entre les Caco-2/15 indifférenciées (-2 PC) et différenciées (30 PC). Chez les cellules HIEC, le niveau relatif d'activation de Yes ne diffère pas significativement de celui retrouvé chez les cellules Caco-2/15 indifférenciées (Figure 15B).

Comme nous pouvons le constater, seulement Fyn et Yes exhibent des profils d'activation relative qui sont différents selon l'état de différenciation des cellules épithéliales intestinales. Bien qu'il y ait des changements significatifs pour l'expression d'une kinase, ces changements ne se traduisent pas nécessairement par des changements significatifs dans les niveaux relatifs d'activation de la kinase comme nous l'avons constaté pour Src. De plus, il faut porter une attention particulière à l'activation de Src et Fyn chez les cellules HIEC puisqu'elles sont distinctes de celles observées chez les cellules Caco-2/15 indifférenciées.

3. Les cellules épithéliales intestinales entrent en apoptose lors de l'inhibition de l'activité catalytique des TKs Src.

Puisqu'il existe des divergences dans l'expression et l'activation des TKs Src et que la survie des cellules épithéliales intestinales est régulée par des mécanismes différents selon l'état de différenciation, nous nous sommes intéressés à l'implication potentielle des TKs Src dans la régulation de la survie cellulaire et ce, selon l'état de différenciation. Pour ce faire, nous avons analysé l'effet sur la survie cellulaire de l'inhibition de l'activité kinase des TKs Src par les inhibiteurs pharmacologiques suivants: le PP2 et

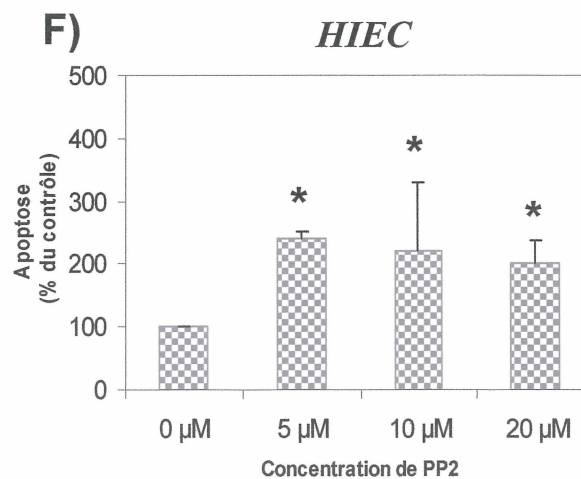
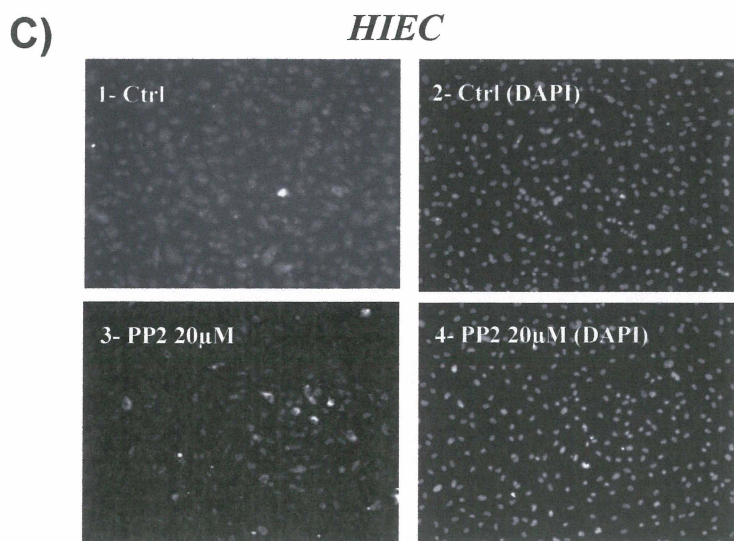
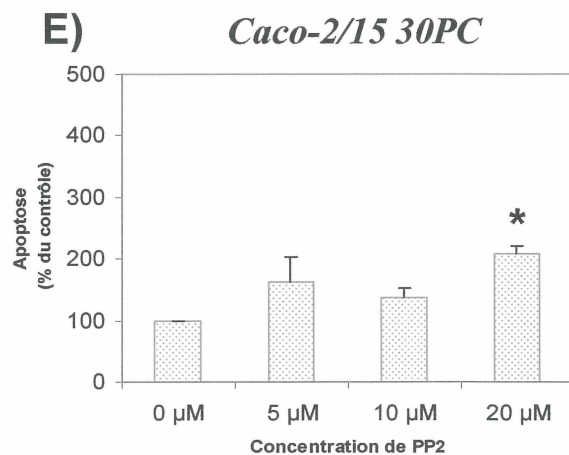
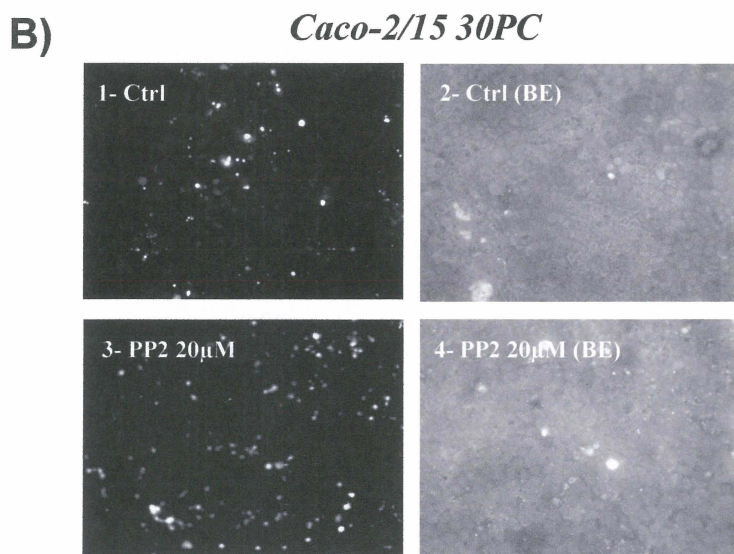
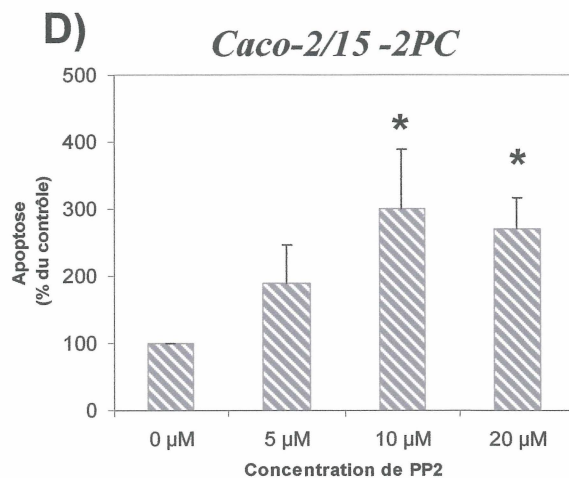
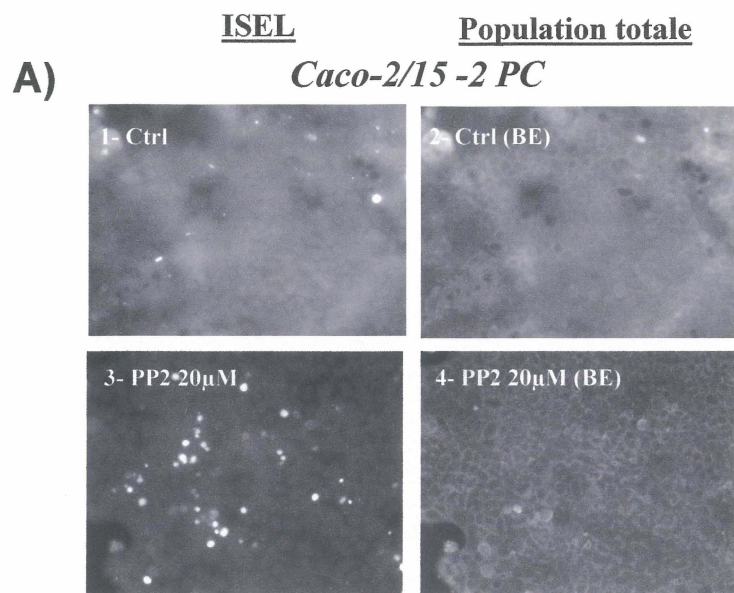
l'herbimycine A. L'apoptose a été visualisée par ISEL et des index apoptotiques relatifs ont été établis (i.e. index apoptotiques des cellules traitées comparés à ceux des cellules contrôles respectives X 100%). Pour chaque inhibiteur, nous avons effectué des courbes doses-réponses afin d'établir la concentration de travail à utiliser pour les expériences ultérieures.

3.1 Les cellules épithéliales intestinales entrent en apoptose lorsque l'activité catalytique des TKs Src est inhibée par le PP2.

Lorsque l'activité catalytique de TKs Src est inhibée par le PP2 à 20 μ M, il y a induction d'apoptose significative tant pour les Caco-2/15 indifférenciées (Figure 16A-3), les Caco-2/15 différenciées (Figure 16B-3) et pour les HIEC (Figure 16C-3). Ceci se visualise par l'augmentation du nombre de cellules apoptotiques dans les cellules traitées en comparaison avec les contrôles respectifs (Figure 16A-1 ; Figure 16B-1; Figure 16C-1) et se répercute dans les index apoptotiques relatifs lorsqu'il y a présence de 20 μ M de PP2 (Figure 16D-F). Nous remarquons que la susceptibilité à entrer en apoptose est différente selon l'état de différenciation lors de la perte de l'activité kinase des TKs Src. En effet, les cellules Caco-2/15 indifférenciées présentent des index apoptotiques relatifs plus élevés que ceux des cellules Caco-2/15 différenciées et des HIEC quand l'activité des TKs Src est inhibée avec le PP2 (Figure 16D-F).

Comme montré à la Figure 16D, les cellules Caco-2/15 indifférenciées sont affectées par l'ajout de PP2. Elles ne répondent toutefois pas de façon dose-dépendante avec les

Figure 16. *L'inhibition de l'activité kinase des TKs Src par le PP2 induit l'apoptose chez les cellules épithéliales intestinales humaines.* **A-C** Micrographies en fluorescence représentatives d'ISELs effectués pour détecter les noyaux apoptotiques sur des **(A)** Caco-2/15 indifférenciées (-2 PC), des **(B)** Caco-2/15 différenciées (30 PC) et des **(C)** HIEC-6. Les cellules ont été cultivées sur des lamelles de verre en présence de 10% de FBS pour les Caco-2/15 et de 5% de FBS pour les HIEC-6. Lors de l'atteinte de confluence désirée, les cellules ont été incubées pendant 48 heures dans un milieu sans sérum seul (ctrl; **A1-2**, **B1-2** et **C1-2**) ou en présence de PP2 20 μ M (+ PP2; **A3-4**, **B3-4** et **C3-4**). Un ISEL a été effectué et visualisé au microscope à fluorescence (grossissement original; HIEC-6 : 100X et Caco-2/15 : 200X). Les cellules apoptotiques (**A1** et **3**, **B1** et **3**, **C1** et **3**) sont marquées à la FITC. Les populations cellulaires totales (**A2** et **4**, **B2** et **4**, **C2** et **4**) sont colorées au bleu d'Evan (BE) ou au DAPI. **D-F** ISELs effectués tels que décrits en **A-C** sur des Caco-2/15 indifférenciées (-2 PC) (**D**), des Caco-2/15 différenciées (30 PC) (**E**) et des HIEC-6 (**F**), mais les doses de PP2 ont été de 0 (Ctrl), 5, 10 et 20 μ M. Les index apoptotiques (exprimés en pourcentage) ont été établis en calculant le rapport des cellules apoptotiques/population cellulaire totale ($n \geq 300$) X 100%. Des index apoptotiques relatifs ont ensuite été établis en comparant les index apoptotiques obtenus avec ceux des cellules contrôles respectives X 100% (exprimé en % du contrôle). Chaque colonne représente la moyenne des index apoptotiques relatifs \pm SEM (« standard error of the mean ») pour chacune des doses pour au moins 3 expériences distinctes ($n \geq 3$). Les différences significatives ($0,001 \leq p \leq 0,05$) entre les doses de traitements et les contrôles sont indiquées par des astérisques (*).



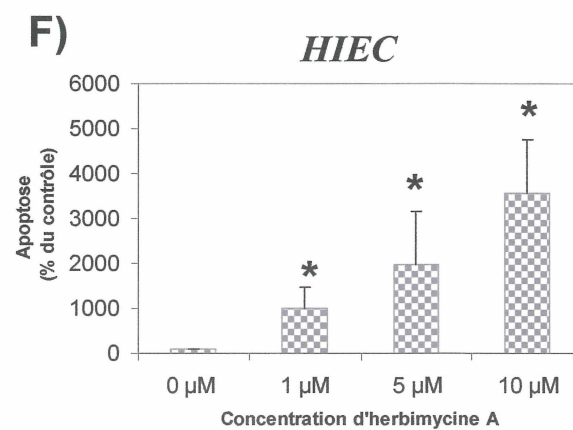
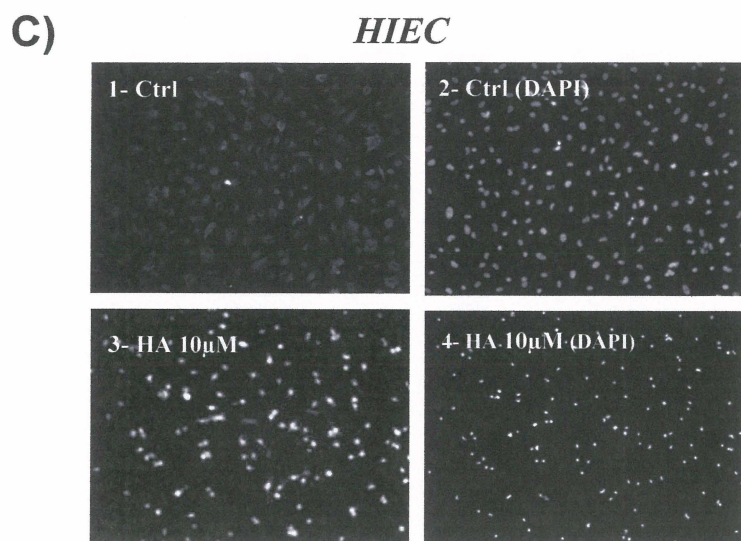
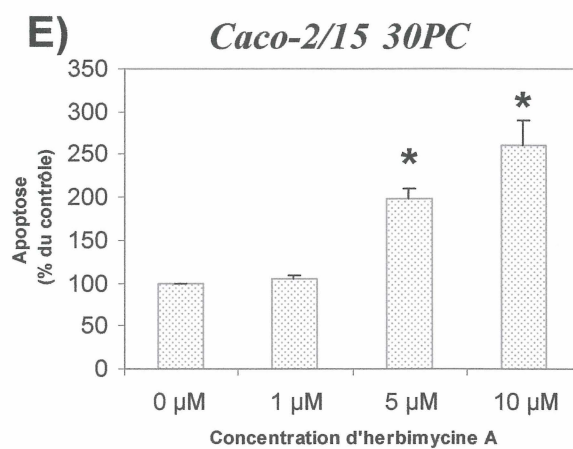
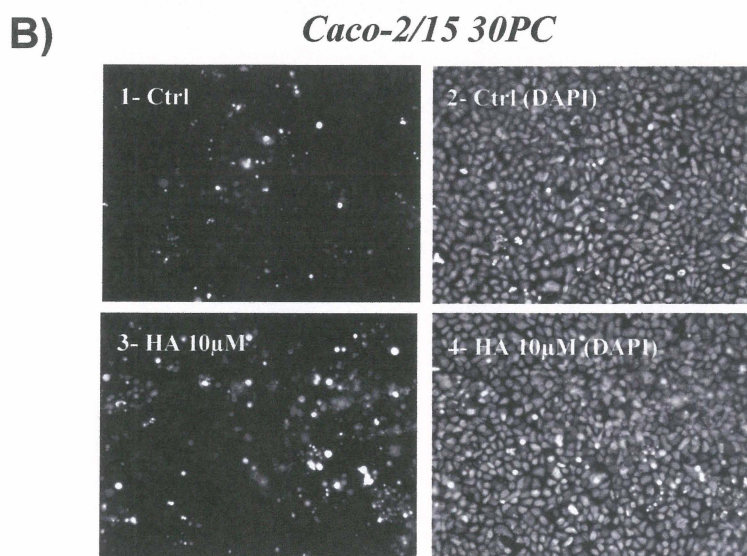
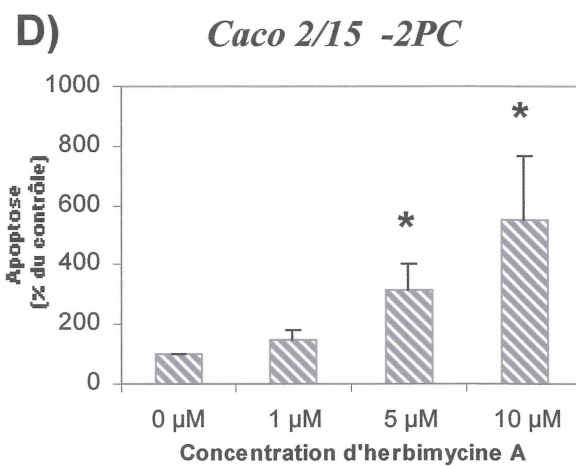
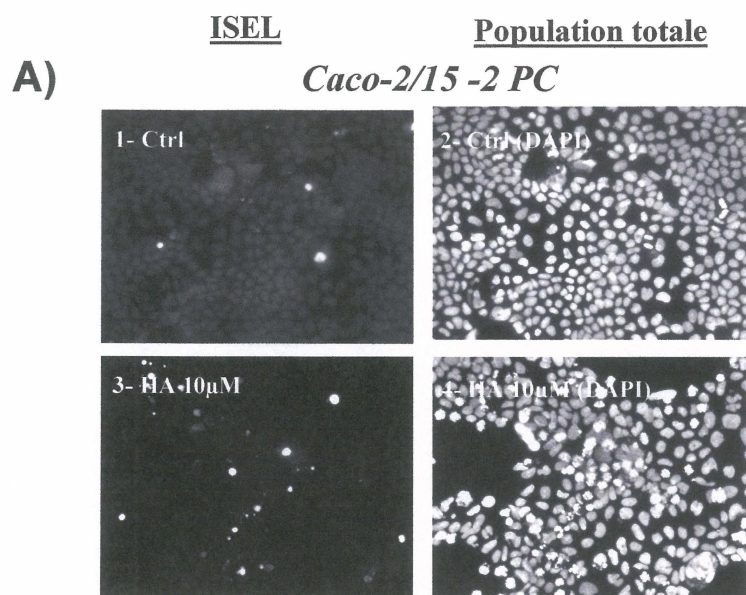
concentrations de PP2 utilisées puisque le maximum d'apoptose survient dès 10 μ M de PP2 (Figure 16D). À une dose plus élevée, il semble y avoir un plafonnement des index apoptotiques relatifs, significativement distincts du contrôle (Figure 16D). Pour ce qui est des Caco-2/15 différenciées (Figure 16E), une concentration de 20 μ M de PP2 est nécessaire pour avoir un effet significatif. Tout comme les Caco-2/15 indifférenciées, la réponse au PP2 n'est pas dose-dépendante avec les concentrations utilisées pour les cellules Caco-2/15 différenciées. Pour ce qui est des HIEC, elles sont sensibles significativement à l'inhibition de l'activité catalytique des TKs Src par le PP2 dès l'ajout de 5 μ M (Figure 16F). Il semblerait d'ailleurs que l'effet du PP2 soit à son maximum à cette dose. Il y a ensuite plafonnement des index apoptotiques relatifs, toujours significatifs des contrôles respectifs (Figure 16F).

Les courbes doses-réponses servaient à établir la concentration de travail de PP2 à utiliser dans les expériences subséquentes. Puisque la seule dose qui était significative pour toutes les cellules utilisées était de 20 μ M, nous avons utilisé celle-ci.

3.2 Les cellules épithéliales intestinales entrent en apoptose lorsque l'activité catalytique des TKs Src est inhibée par l'herbimycine A.

Tout comme avec le PP2, lorsque l'on inhibe l'activité catalytique des TKs Src avec l'herbimycine A, il y a une induction significative d'apoptose chez les Caco-2/15 indifférenciées (Figure 17A-3), les Caco-2/15 différenciées (Figure 17B-3) et chez les HIEC (Figure 17C-3). La même tendance quant à la susceptibilité à entrer en apoptose et l'état de différenciation des Caco-2/15 est suivie (Figure 17D; Figure 17E) lors de la

Figure 17. *L'inhibition de l'activité kinase des TKs Src par l'herbimycine A induit l'apoptose chez les cellules épithéliales intestinales humaines.* **A-C** Micrographies en fluorescence représentatives d'ISELs effectués pour détecter les noyaux apoptotiques sur des **(A)** Caco-2/15 indifférenciées (-2 PC), des **(B)** Caco-2/15 différenciées (30 PC) et des **(C)** HIEC-6. Les cellules ont été cultivées sur des lamelles de verre en présence de 10% de FBS pour les Caco-2/15 et de 5% de FBS pour les HIEC-6. Lors de l'atteinte de confluence désirée, les cellules ont été incubées pendant 48 heures dans un milieu sans sérum seul (ctrl; **A1-2**, **B1-2** et **C1-2**) ou en présence d'herbimycine A 10 μ M (+ HA; **A3-4**, **B3-4** et **C3-4**). Un ISEL a été effectué et visualisé au microscope à fluorescence (grossissement original; HIEC-6 : 100X et Caco-2/15 : 200X). Les cellules apoptotiques (**A1** et **3**, **B1** et **3**, **C1** et **3**) sont marquées à la FITC. Les populations cellulaires totales (**A2** et **4**, **B2** et **4**, **C2** et **4**) sont colorées au DAPI. **D-F** ISELs effectués tels que décrits en **A-C** sur des Caco-2/15 indifférenciées (-2 PC) (**D**), des Caco-2/15 différenciées (30 PC) (**E**) et des HIEC-6 (**F**), mais les doses d'herbimycine A ont été de 0 (Ctrl), 1, 5 et 10 μ M. Les index apoptotiques (exprimés en pourcentage) ont été établis en calculant le rapport des cellules apoptotiques/population cellulaire totale ($n \geq 300$) X 100%. Des index apoptotiques relatifs ont ensuite été établis en comparant les index apoptotiques obtenus avec ceux des cellules contrôles respectives X 100% (exprimé en % du contrôle). Chaque colonne représente la moyenne des index apoptotiques relatifs \pm SEM (« standard error of the mean ») pour chacune des doses pour au moins 3 expériences distinctes ($n \geq 3$). Les différences significatives ($0,001 \leq p \leq 0,05$) entre les doses de traitements et les contrôles sont indiquées par des astérisques (*).



perte de l'activité kinase. Toutefois, la différence majeure entre l'herbimycine A et le PP2, c'est que les HIEC démontent une susceptibilité à entrer en apoptose qui est grandement accrue en présence d'herbimycine A, se trouvant ainsi plus susceptibles que les Caco-2/15 indifférenciées (Figure 17F).

Les cellules Caco-2/15 indifférenciées répondent significativement dès l'ajout d'une concentration de 5 μ M d'herbimycine A (Figure 17D). Leur réponse à l'herbimycine A est dose-dépendante. Pour ce qui est des Caco-2/15 différenciées, l'herbimycine A agit aussi de manière dose-dépendante et l'effet est significatif à 5 et 10 μ M (Figure 17E). Les HIEC (Figure 17F) sont grandement affectées lors de l'inhibition de l'activité catalytique des TKs Src par l'herbimycine A puisque leurs index apoptotiques relatifs sont très élevés (1000% - 3800% du contrôle). L'addition de seulement 1 μ M d'herbimycine A suffit pour observer des changements significatifs. Tout comme pour les Caco-2/15, la réponse est dose-dépendante.

Les courbes doses-réponses nous servaient à établir la concentration de travail d'herbimycine A à utiliser dans les expériences subséquentes. Puisque 10 μ M était significative pour toutes les cellules utilisées, nous avons utilisé celle-ci.

En terminant, l'ensemble de ces résultats indiquent déjà que les TKs Src sont impliquées dans la régulation de la survie des cellules épithéliales intestinales, car celles-ci entrent en apoptose lors de l'inhibition de l'activité kinase des TKs Src. Par contre, cette implication varie selon l'état de différenciation et la lignée cellulaire.

4. Les impacts sur les niveaux relatifs d'activation des TKs Src lors de l'inhibition de l'activité catalytique des TKs Src par le PP2 ou l'herbimycine A.

Dans la section précédente, il a été démontré que le PP2 et l'herbimycine A induisent l'apoptose chez les cellules épithéliales intestinales. Comme ces inhibiteurs ne sont pas spécifiques à une TK Src particulière et que l'affinité peut être différente pour chaque, nous avons analysé l'effet de ces inhibiteurs sur les niveaux relatifs d'activation de chacune des TKs Src étudiées. Dans un premier temps, les cellules ont été traitées, puis chaque TK Src a été immunoprécipitée. Dans un second temps, nous avons détecté par immunobuvardage d'abord la forme activée (tyrosine phosphorylée) en utilisant l'anticorps anti-phospho-Src (Tyr416) pour Src ou l'anticorps anti-phosphotyrosine pour Fyn et Yes, et ensuite la quantité totale de la TK Src immunoprécipitée respective a été détectée. Des niveaux relatifs d'activation en % du contrôle ont été établis (i.e. niveaux relatifs d'activation de la TK Src comparés à ceux des cellules contrôles respectives X 100%).

Tout d'abord, le PP2 à 20 μ M cause une diminution significative des niveaux relatifs d'activation de Src tant chez les cellules Caco-2/15 indifférenciées et différenciées ainsi que chez les HIEC (Figure 18A, puits 2, 5 et 8; Figure 18B). Lors de l'utilisation de l'herbimycine A, nous remarquons que les niveaux relatifs d'activation de Src des cellules Caco-2/15 et des HIEC ne sont pas affectés significativement (Figure 18B). Des deux inhibiteurs utilisés, seul le PP2 affectent les niveaux relatifs d'activation de Src.

Figure 18. *Activation relative de p60^{Src} chez les cellules épithéliales intestinales lors de l'inhibition des TKs Src à l'aide d'inhibiteurs pharmacologiques.* (A) Analyses en Western blot représentatives de l'activation de la kinase p60^{Src} chez les cellules Caco-2/15 indifférenciées (-2 PC) (puits 1 à 3), Caco-2/15 différenciées (30 PC) (puits 4 à 6) et HIEC-6 (puits 7 à 9). Les cellules ont été cultivées en présence de 10% de FBS pour les Caco-2/15 et de 5% de FBS pour les HIEC-6. Lors de l'atteinte de confluence désirée, les cellules ont été incubées pendant 48 heures dans un milieu sans sérum seul (ctrl ; puits 1, 4 et 7), en présence de PP2 20μM (PP2; puits 2, 5 et 8) ou d'herbimycine A 10μM (HA; puits 3, 6 et 9). Les cellules ont ensuite été lysées dans du tampon RIPA et s'en est suivi une immunoprécipitation de p60^{Src}. 30μl d'immunoprécipitat ont été séparés par électrophorèse sur gel SDS-PAGE 7,5% sous des conditions réductrices, électrotransférés sur membrane de nitrocellulose et immunodétectés avec un anticorps spécifique de la forme activée de Src (p^{tyr416}p60^{Src}). La détection de la quantité totale de p60^{Src} immunoprécipitée a été effectuée avec l'anticorps ayant servi à l'immunoprécipitation, afin de normaliser la quantité de protéines dans chacun des puits. (B) Les bandes de protéines ont été numérisées, puis les niveaux relatifs d'activation de p60^{Src} ont été évalués en établissant le rapport $\frac{p^{tyr416}p60^{Src}}{p60^{Src}}$ en utilisant le logiciel Scion Image. Ces niveaux ont ensuite été comparés avec ceux des cellules contrôles X 100% (exprimé en % du contrôle). Chaque colonne représente la moyenne \pm SEM (« standard error of the mean ») pour chaque traitement de chaque lignée cellulaire et ce, pour au moins 3 expériences distinctes (n \geq 3). Les différences significatives (0,001 \leq p \leq 0,05) entre les traitements et les contrôles sont indiquées par des astérisques (*).

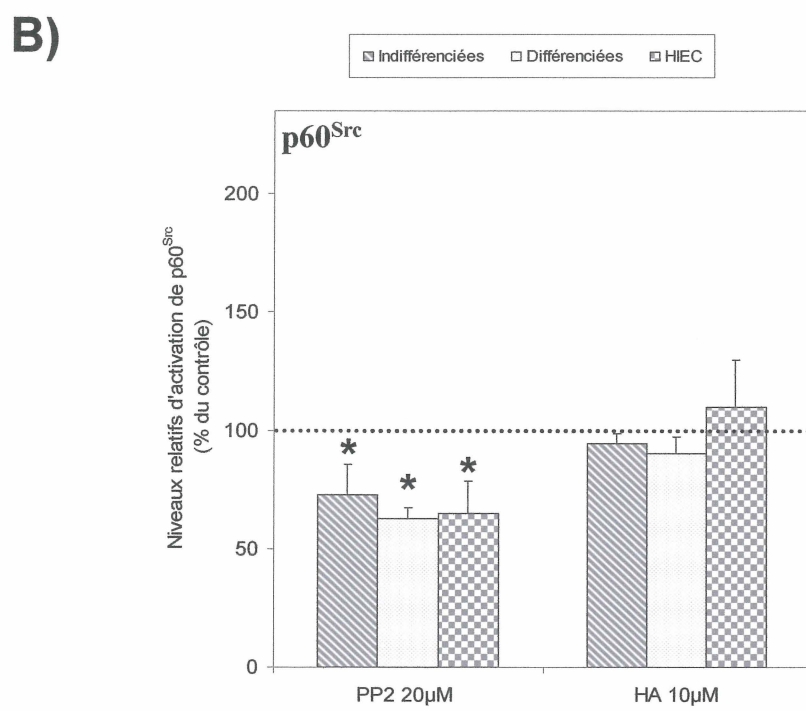
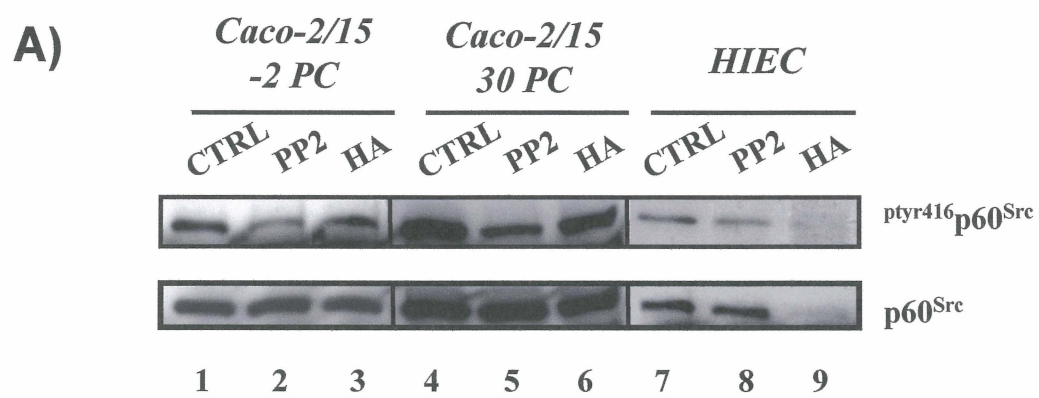


Figure 19. *Activation relative de p59^{Fyn} chez les cellules épithéliales intestinales lors de l'inhibition des TKs Src à l'aide d'inhibiteurs pharmacologiques.* (A) Analyses en Western blot représentatives de l'activation de la kinase p59^{Fyn} chez les cellules Caco-2/15 indifférenciées (-2 PC) (puits 1 à 3), Caco-2/15 différenciées (30 PC) (puits 4 à 6) et HIEC-6 (puits 7 à 9). Les cellules ont été cultivées en présence de 10% de FBS pour les Caco-2/15 et de 5% de FBS pour les HIEC-6. Lors de l'atteinte de confluence désirée, les cellules ont été incubées pendant 48 heures dans un milieu sans sérum seul (ctrl ; puits 1, 4 et 7), en présence de PP2 20μM (PP2; puits 2, 5 et 8) ou d'herbimycine A 10μM (HA; puits 3, 6 et 9). Les cellules ont ensuite été lysées dans du tampon RIPA et s'en est suivi une immunoprécipitation de p59^{Fyn}. 30μl d'immunoprécipitat ont été séparés par électrophorèse sur gel SDS-PAGE 7,5% sous des conditions réductrices, électrotransférés sur membrane de nitrocellulose et immunodétectés avec un anticorps anti-phosphotyrosine pour la détection de la forme activée de p59^{Fyn} (tyrosine phosphorylée ; p^{tyr}p59^{Fyn}). La détection de la quantité totale de p59^{Fyn} immunoprécipitée a été effectuée avec l'anticorps ayant servi à l'immunoprécipitation, afin de normaliser la quantité de protéines dans chacun des puits. (B) Les bandes de protéines ont été numérisées, puis les niveaux relatifs d'activation de p59^{Fyn} ont été évalués en établissant le rapport p^{tyr}p59^{Fyn}/p59^{Fyn} en utilisant le logiciel Scion Image. Ces niveaux ont ensuite été comparés avec ceux des cellules contrôles X 100% (exprimé en % du contrôle). Chaque colonne représente la moyenne ± SEM (« standard error of the mean ») pour chaque traitement de chaque lignée cellulaire et ce, pour au moins 3 expériences distinctes (n≥3). Les différences significatives (0,001 ≤ p ≤ 0,05) entre les traitements et les contrôles sont indiquées par des astérisques (*).

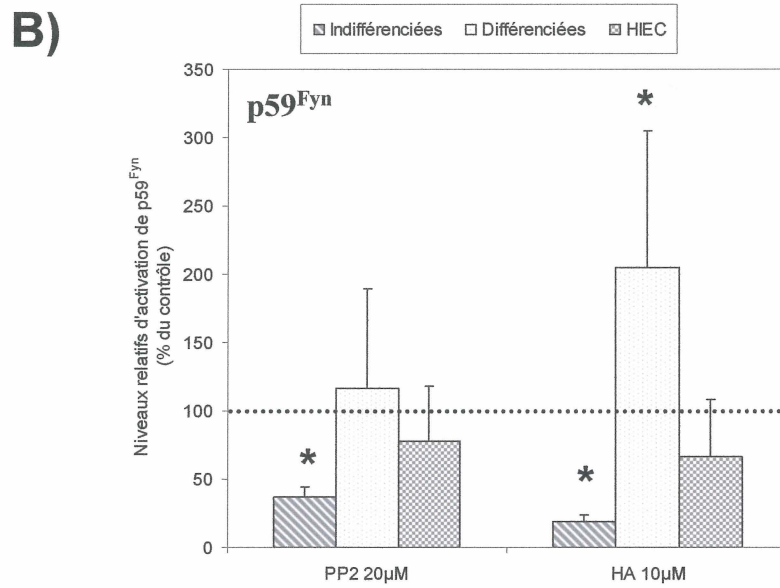
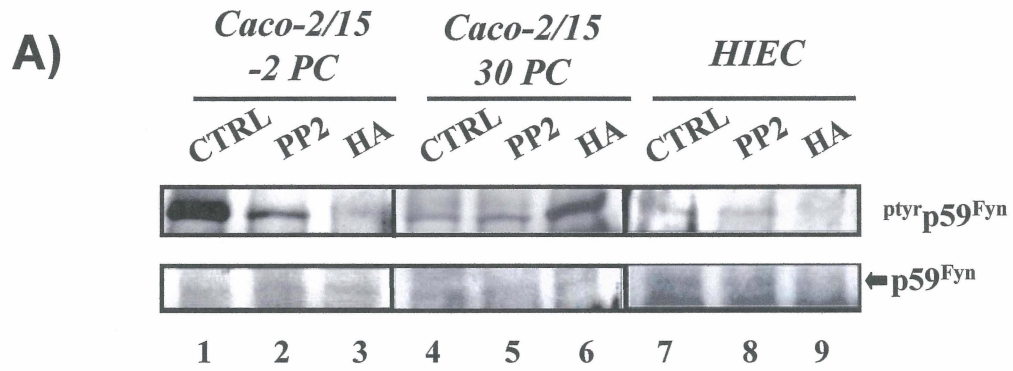
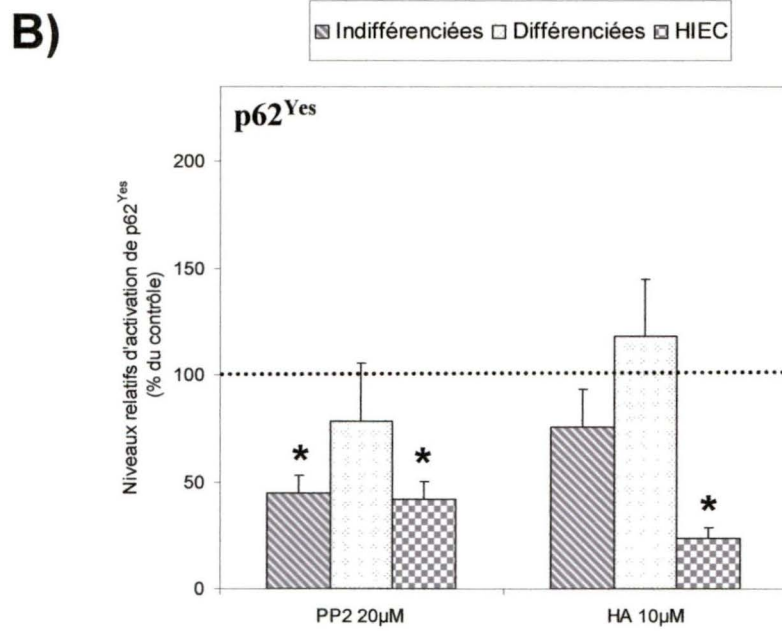
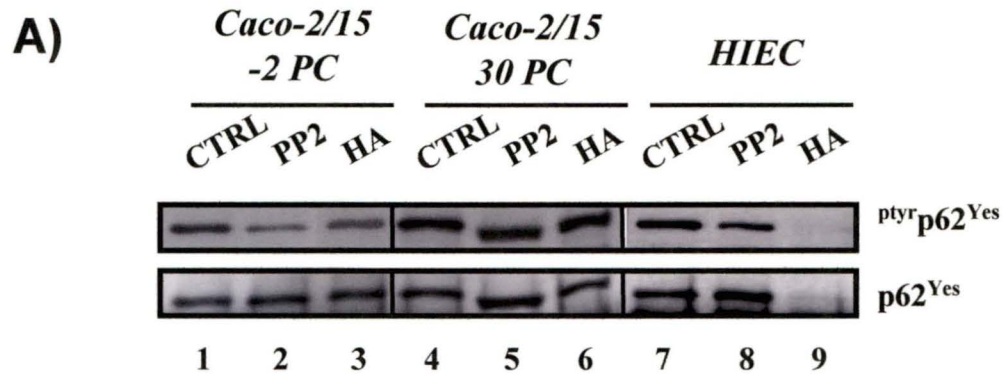


Figure 20. *Activation relative de p62^{Yes} chez les cellules épithéliales intestinales lors de l'inhibition des TKs Src à l'aide d'inhibiteurs pharmacologiques.* **(A)** Analyses en Western blot représentatives de l'activation de la kinase p62^{Yes} chez les cellules Caco-2/15 indifférenciées (-2 PC) (puits 1 à 3), Caco-2/15 différenciées (30 PC) (puits 4 à 6) et HIEC-6 (puits 7 à 9). Les cellules ont été cultivées en présence de 10% de FBS pour les Caco-2/15 et de 5% de FBS pour les HIEC-6. Lors de l'atteinte de confluence désirée, les cellules ont été incubées pendant 48 heures dans un milieu sans sérum seul (ctrl ; puits 1, 4 et 7), en présence de PP2 20μM (PP2; puits 2, 5 et 8) ou d'herbimycine A 10μM (HA; puits 3, 6 et 9). Les cellules ont ensuite été lysées dans du tampon RIPA et s'en est suivi une immunoprécipitation de p62^{Yes}. 30μl d'immunoprécipitat ont été séparés par électrophorèse sur gel SDS-PAGE 7,5% sous des conditions réductrices, électrotransférés sur membrane de nitrocellulose et immunodétectés avec un anticorps anti-phosphotyrosine pour la détection de la forme activée de p62^{Yes} (tyrosine phosphorylée; p_{tyr}p62^{Yes}). La détection de la quantité totale de p62^{Yes} immunoprécipitée a été effectuée avec l'anticorps ayant servi à l'immunoprécipitation, afin de normaliser la quantité de protéines dans chacun des puits. **(B)** Les bandes de protéines ont été numérisées, puis les niveaux relatifs d'activation de p62^{Yes} ont été évalués en établissant le rapport p_{tyr}p62^{Yes}/p62^{Yes} en utilisant le logiciel Scion Image. Ces niveaux ont ensuite été comparés avec ceux des cellules contrôles X 100% (exprimé en % du contrôle). Chaque colonne représente la moyenne ± SEM (« standard error of the mean ») pour chaque traitement de chaque lignée cellulaire et ce, pour au moins 3 expériences distinctes (n≥3). Les différences significatives (0,001 ≤ p ≤ 0,05) entre les traitements et les contrôles sont indiquées par des astérisques (*).



Le PP2 et l'herbimycine A affectent les niveaux relatifs d'activation de la kinase Fyn (Figure 19A; Figure 19B). Plus particulièrement, le PP2 cause une baisse significative des niveaux relatifs d'activation de Fyn chez les Caco-2/15 indifférenciées, sans toutefois affecter ceux des cellules Caco-2/15 différenciées (Figure 19B). Les HIEC, pour leur part, ne sont pas affectées significativement par le PP2 (Figure 19B). L'herbimycine A, quant à elle, fait chuter significativement l'activation de Fyn chez les cellules Caco-2/15 indifférenciées, mais elle cause une augmentation d'activation chez les cellules Caco-2/15 différenciées (Figure 19B). L'activation de Fyn chez les HIEC n'est toujours pas affectée de façon significative par l'herbimycine A (Figure 19B).

Les niveaux relatifs d'activation de Yes peuvent être affectés par la présence de PP2 ou d'herbimycine A comme nous pouvons le constater à la Figure 20. Tout d'abord, le PP2 engendre une baisse significative de l'activation de Yes seulement chez les cellules Caco-2/15 indifférenciées et les HIEC (Figure 20B). Pour ce qui est de l'herbimycine A, elle cause une baisse d'activation significative seulement chez les HIEC (Figure 20B). L'activation de Yes chez les cellules Caco-2/15 différenciées n'est donc pas affectée significativement par aucun de ces deux inhibiteurs (Figure 20B).

À la lumière de ces résultats, nous pouvons affirmer que l'effet de l'inhibition de l'activité kinase des TKs Src, soit par le PP2 ou l'herbimycine A, causent des effets sur les niveaux relatifs d'activation des TKs Src qui sont distincts selon la kinase, l'état de différenciation et selon la lignée cellulaire. De plus, un inhibiteur peut causer des effets diamétralement opposés selon l'état de différenciation, comme par exemple

l'herbimycine A qui fait chuter l'activation de Fyn chez les cellules indifférenciées, mais qui augmente celle-ci chez les cellules Caco-2/15 différenciées (Figure 19B).

5. Les impacts sur les niveaux relatifs d'activation des TKs Src lors de l'inhibition de Fak ou de la signalisation intégrines-Fak.

Les TKs Src sont potentiellement impliquées dans la signalisation intégrines-Fak, car elles peuvent être recrutées et activées par Fak (Cornillon et al., 2003; Schaller et al., 1994; Schlaepfer et al., 1994). Comme nous cherchons à vérifier l'implication potentielle des TKs Src dans les cassettes de signalisation de Fak régulant la survie et/ou l'apoptose/anoïkose des cellules épithéliales intestinales, nous avons analysé l'effet de l'inhibition de Fak, par l'ajout de cytochalasine D (CD) à 1 μ M, sur les niveaux relatifs d'activation de chaque TKs Src. Nous avons aussi analysé l'effet de l'inhibition de la signalisation intégrines-Fak, en maintenant nos cellules en suspension, sur les niveaux relatifs d'activation des TKs Src. Pour cette expérience, nous avons procédé par immunoprécipitation suivie d'immunobuvardage pour détecter la forme activée et la quantité totale de kinase. Les niveaux relatifs d'activation des TKs Src ont ensuite été calculés.

Lorsque Fak est inhibée par la CD ou que les cellules sont maintenues en suspension, il n'y a pas de changements significatifs dans les niveaux d'activation de Src, que ce soit pour les cellules Caco-2/15 indifférenciées, différenciées ou encore chez les HIEC

Figure 21. *Activation relative de p60^{Src} chez les cellules épithéliales intestinales lors de l'inhibition de p125^{Fak} et de la signalisation intégrines-Fak. (A) Analyses en Western blot représentatives de l'activation de la kinase p60^{Src} chez les cellules Caco-2/15 indifférenciées (-2 PC) (puits 1 à 3), Caco-2/15 différenciées (30 PC) (puits 4 à 6) et HIEC-6 (puits 7 à 9). Les cellules ont été cultivées en présence de 10% de FBS pour les Caco-2/15 et de 5% de FBS pour les HIEC-6. Lors de l'atteinte de confluence désirée, les cellules ont été incubées pendant 48 heures dans un milieu sans sérum seul (ctrl ; puits 1, 4 et 7), en présence de cytochalasine D 1µM (CD; puits 2, 5 et 8) ou maintenues en suspension (Susp.; puits 3, 6 et 9). Les cellules ont ensuite été lysées dans du tampon RIPA et s'en est suivi une immunoprécipitation de p60^{Src}. 30µl d'immunoprécipitat ont été séparés par électrophorèse sur gel SDS-PAGE 7,5% sous des conditions réductrices, électrotransférés sur membrane de nitrocellulose et immunodétectés avec un anticorps spécifique de la forme active de Src (p^{tyr416}p60^{Src}). La détection de la quantité totale de p60^{Src} immunoprécipitée a été effectuée avec l'anticorps ayant servi à l'immunoprécipitation, afin de normaliser la quantité de protéines dans chacun des puits. (B) Les bandes de protéines ont été numérisées, puis les niveaux relatifs d'activation de p60^{Src} ont été évalués en établissant le rapport $\frac{p^{tyr416}p60^{Src}}{p60^{Src}}$ en utilisant le logiciel Scion Image. Ces niveaux ont ensuite été comparés avec ceux des cellules contrôles X 100% (exprimé en % du contrôle). Chaque colonne représente la moyenne \pm SEM (« standard error of the mean ») pour chaque traitement de chaque lignée cellulaire et ce, pour au moins 3 expériences distinctes (n \geq 3).*

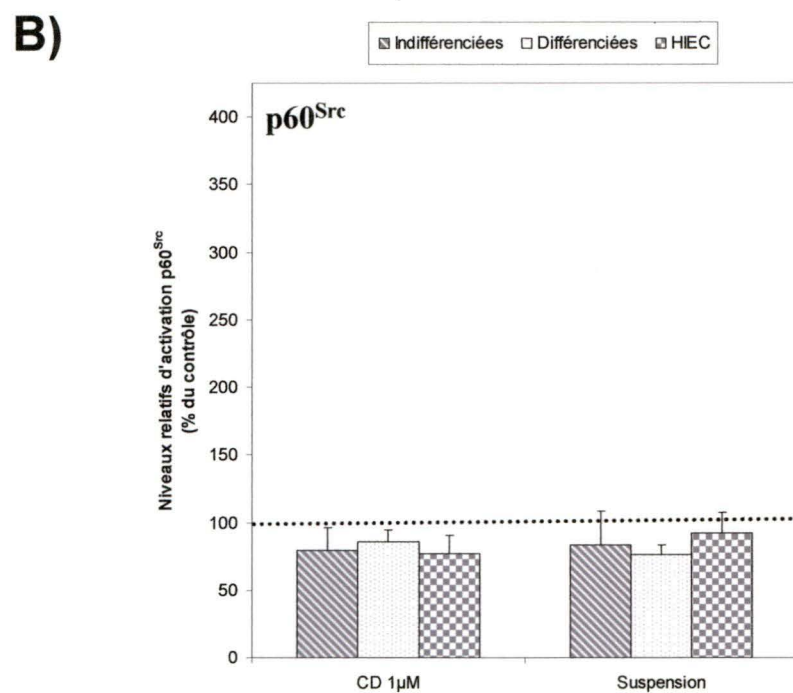
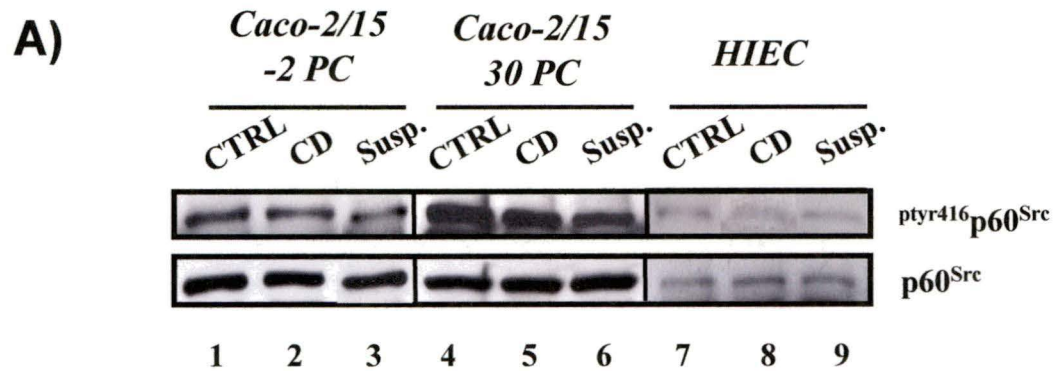
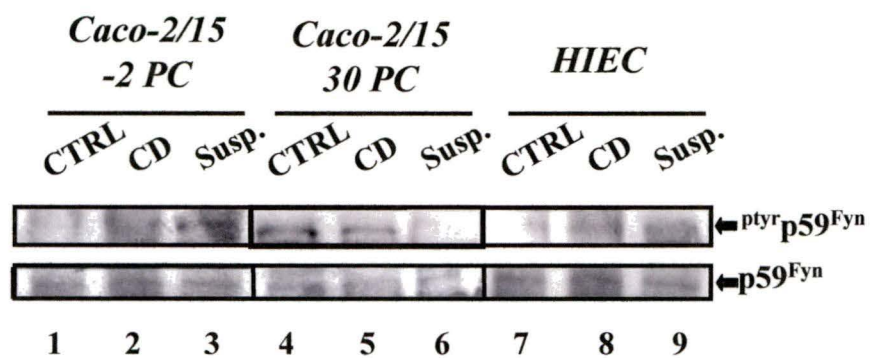


Figure 22. *Activation relative de p59^{Fyn} chez les cellules épithéliales intestinales lors de l'inhibition de p125^{Fak} et de la signalisation intégrines-Fak.* (A) Analyses en Western blot représentatives de l'activation de la kinase p59^{Fyn} chez les cellules Caco-2/15 indifférenciées (-2 PC) (puits 1 à 3), Caco-2/15 différenciées (30 PC) (puits 4 à 6) et HIEC-6 (puits 7 à 9). Les cellules ont été cultivées en présence de 10% de FBS pour les Caco-2/15 et de 5% de FBS pour les HIEC-6. Lors de l'atteinte de confluence désirée, les cellules ont été incubées pendant 48 heures dans un milieu sans sérum seul (ctrl ; puits 1, 4 et 7), en présence de cytochalasine D 1 μ M (CD; puits 2, 5 et 8) ou maintenues en suspension (Susp.; puits 3, 6 et 9). Les cellules ont ensuite été lysées dans du tampon RIPA et s'en est suivi une immunoprécipitation de p59^{Fyn}. 30 μ l d'immunoprécipitat ont été séparés par électrophorèse sur gel SDS-PAGE 7,5% sous des conditions réductrices, électrotransférés sur membrane de nitrocellulose et immunodétectés avec un anticorps anti-phosphotyrosine pour la détection de la forme activée de p59^{Fyn} (tyrosine phosphorylée; ^{tyr}p59^{Fyn}). La détection de la quantité totale de p59^{Fyn} immunoprécipitée a été effectuée avec l'anticorps ayant servi à l'immunoprécipitation, afin de normaliser la quantité de protéines dans chacun des puits. (B) Les bandes de protéines ont été numérisées, puis les niveaux relatifs d'activation de p59^{Fyn} ont été évalués en établissant le rapport ^{tyr}p59^{Fyn}/p59^{Fyn} en utilisant le logiciel Scion Image. Ces niveaux ont ensuite été comparés avec ceux des cellules contrôles X 100% (exprimé en % du contrôle). Chaque colonne représente la moyenne \pm SEM (« standard error of the mean ») pour chaque traitement de chaque lignée cellulaire et ce, pour au moins 3 expériences distinctes (n \geq 3). Les différences significatives (0,001 \leq p \leq 0,05) entre les traitements et les contrôles sont indiquées par des astérisques (*).

A)



B)

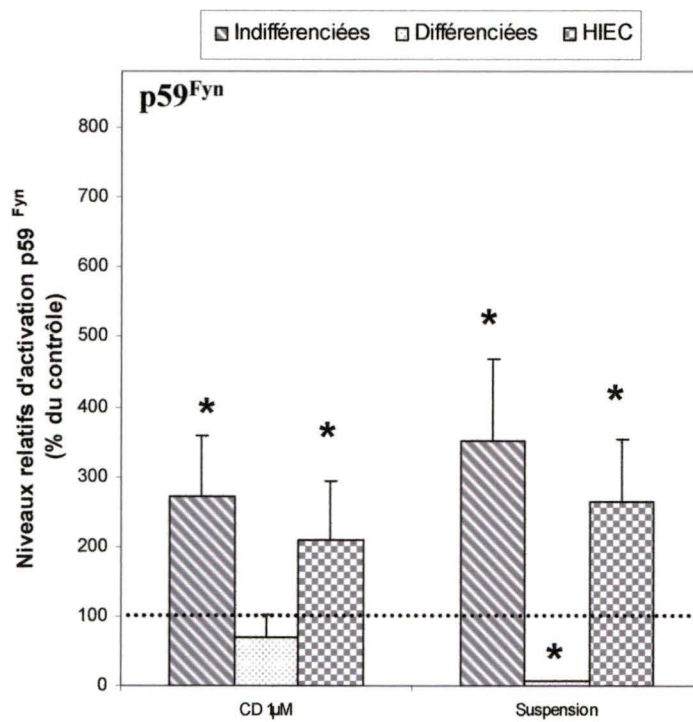
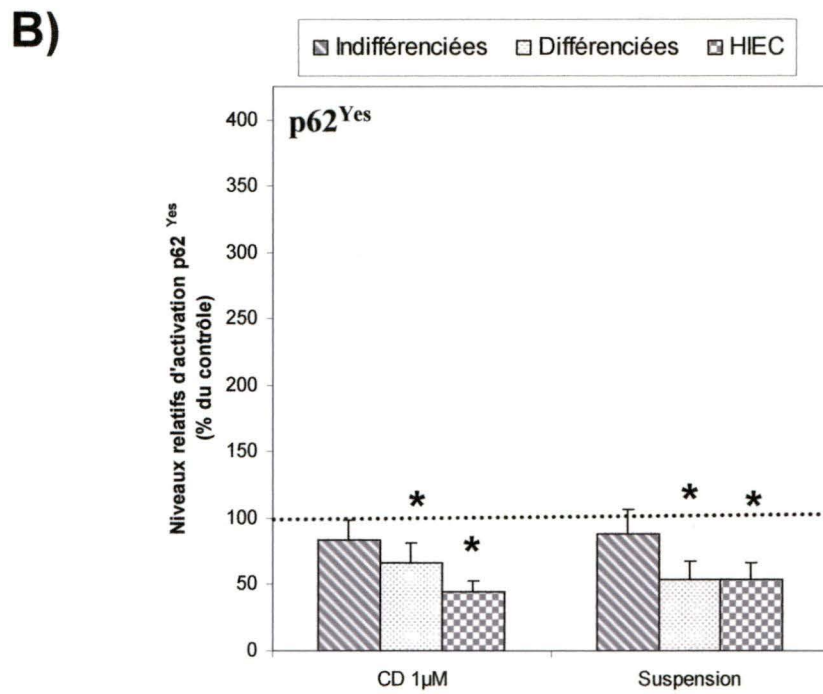
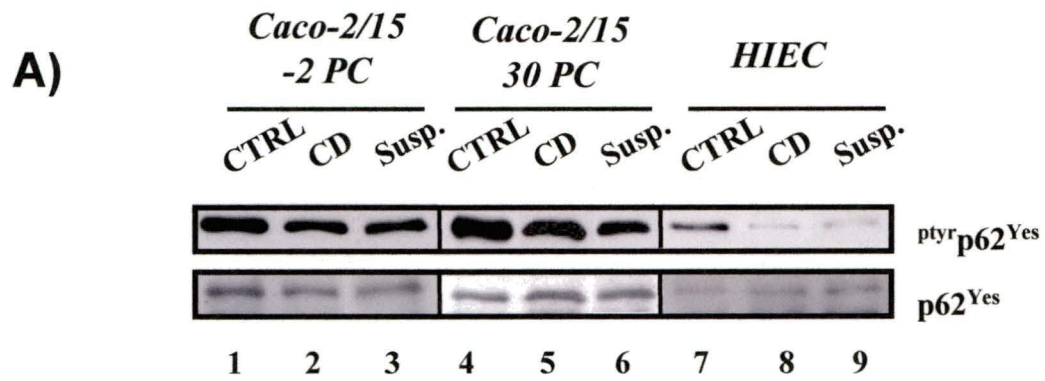


Figure 23. *Activation relative de p62^{Yes} chez les cellules épithéliales intestinales lors de l'inhibition de p125^{Fak} et de la signalisation intégrines-Fak.* (A) Analyses en Western blot représentatives de l'activation de la kinase p62^{Yes} chez les cellules Caco-2/15 indifférenciées (-2 PC) (puits 1 à 3), Caco-2/15 différenciées (30 PC) (puits 4 à 6) et HIEC-6 (puits 7 à 9). Les cellules ont été cultivées en présence de 10% de FBS pour les Caco-2/15 et de 5% de FBS pour les HIEC-6. Lors de l'atteinte de confluence désirée, les cellules ont été incubées pendant 48 heures dans un milieu sans sérum seul (ctrl ; puits 1, 4 et 7), en présence de cytochalasine D 1µM (CD; puits 2, 5 et 8) ou maintenues en suspension (Susp.; puits 3, 6 et 9). Les cellules ont ensuite été lysées dans du tampon RIPA et s'en est suivi une immunoprécipitation de p62^{Yes}. 30µl d'immunoprécipitat ont été séparés par électrophorèse sur gel SDS-PAGE 7,5% sous des conditions réductrices, électrotransférés sur membrane de nitrocellulose et immunodétectés avec un anticorps anti-phosphotyrosine pour la détection de la forme activée de p62^{Yes} (tyrosine phosphorylée; p^{tyr}p62^{Yes}). La détection de la quantité totale de p62^{Yes} immunoprécipitée a été effectuée avec l'anticorps ayant servi à l'immunoprécipitation, afin de normaliser la quantité de protéines dans chacun des puits. (B) Les bandes de protéines ont été numérisées, puis les niveaux relatifs d'activation de p62^{Yes} ont été évalués en établissant le rapport p^{tyr}p62^{Yes}/p62^{Yes} en utilisant le logiciel Scion Image. Ces niveaux ont ensuite été comparés avec ceux des cellules contrôles X 100% (exprimé en % du contrôle). Chaque colonne représente la moyenne ± SEM (« standard error of the mean ») pour chaque traitement de chaque lignée cellulaire et ce, pour au moins 3 expériences distinctes (n≥3). Les différences significatives (0,001 ≤ p ≤ 0,05) entre les traitements et les contrôles sont indiquées par des astérisques (*).



(Figure 21A; Figure 21B). Les niveaux d'activation de Src ne sembleraient pas dépendants ni de l'activation de Fak ni de l'adhésion cellulaire.

Contrairement à Src, les niveaux d'activation relatifs de Fyn sont affectés par l'inhibition de Fak ou de la signalisation intégrines-Fak (Figure 22A; Figure 22B). Chez les cellules Caco-2/15 indifférenciées, nous remarquons une hausse d'activation de Fyn significative lorsqu'il y a inhibition de Fak ou de la signalisation intégrines-Fak (Figure 22B). Les cellules Caco-2/15 différenciées, à l'opposé des cellules indifférenciées, subissent une baisse d'activation significative seulement lorsque les cellules sont maintenues en suspension (Figure 22A, puits 6 ; Figure 22B). Tout comme les Caco-2/15 indifférenciées, les HIEC présentent aussi des hausses d'activation significatives lorsqu'il y a inhibition de Fak ou de la signalisation intégrines-Fak (Figure 22B).

Les niveaux relatifs d'activation de Yes ne varient pas significativement chez les cellules Caco-2/15 indifférenciées que Fak seule ou que la signalisation intégrines-Fak soient inhibées (Figure 23A; Figure 23B). Par contre, des baisses d'activation significatives sont observées tant chez les cellules Caco-2/15 différenciées que chez les HIEC lorsqu'il y a inhibition de Fak ou de la signalisation intégrines-Fak (Figure 23A; Figure 23B).

Ainsi, l'impact de l'inhibition de Fak ou de la signalisation intégrines-Fak sur l'activation des différentes TKs Src varie selon la kinase, l'état de différenciation et la lignée des cellules épithéliales intestinales.

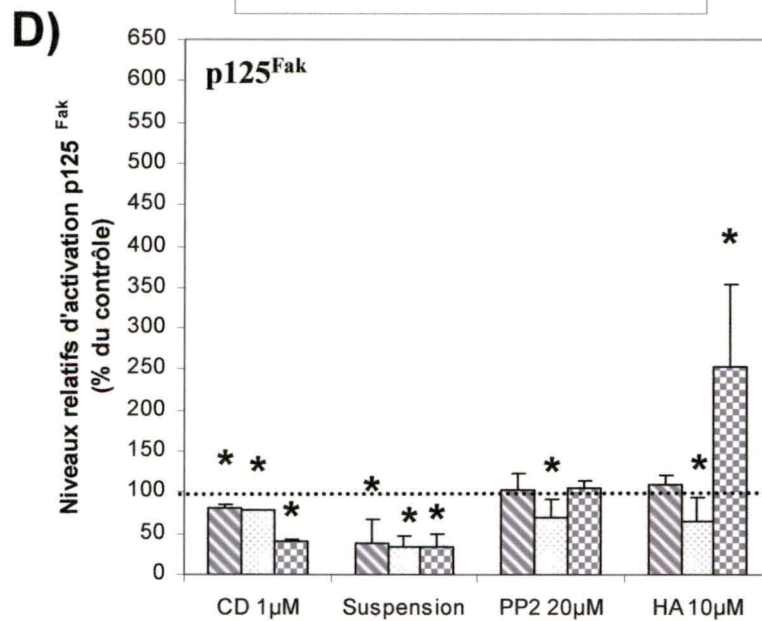
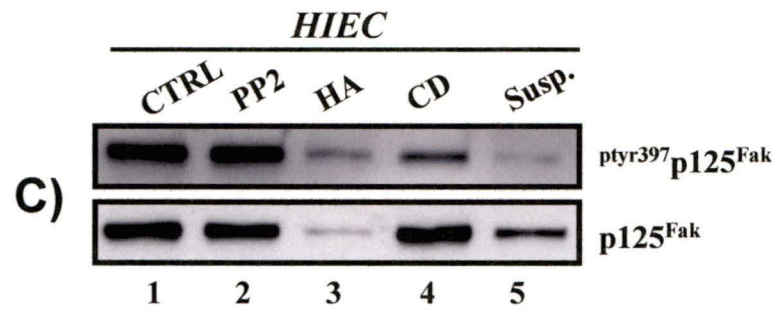
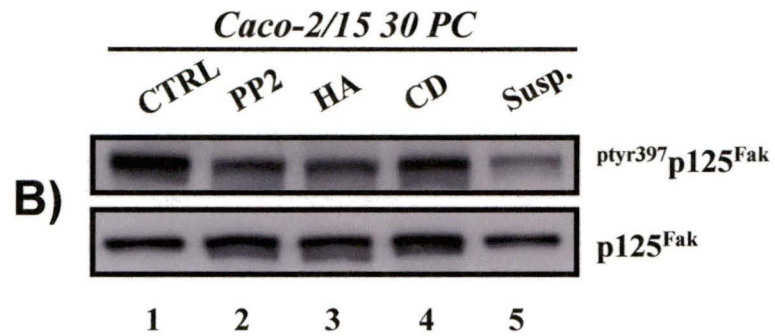
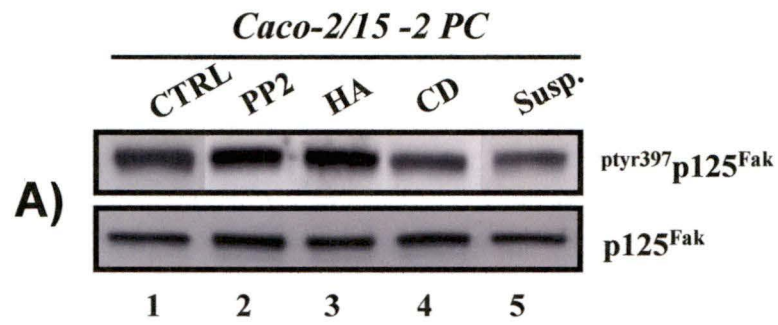
6. Les impacts sur les niveaux relatifs d'activation de Fak lors de l'inhibition de l'activité kinase des TKs Src.

Puisque Fak peut être activée par les TKs Src, nous avons analysé les effets de l'inhibition de l'activité catalytique des TKs Src, en utilisant le PP2 ou l'herbimycine A, sur les niveaux d'activation de Fak. Nous avons d'abord effectué une immunoprécipitation de Fak. Par immunobuvardage, nous avons ensuite détecté la forme activée de Fak (tyrosine phosphorylée en position 397) et la quantité totale de Fak immunoprécipitée. Finalement, nous avons établi les niveaux relatifs d'activation de Fak.

Dans le cadre de cette expérience, nous avons aussi analysé l'activation de Fak lorsqu'il y avait présence de cytochalasine D ou que les cellules étaient maintenues en suspension. Nous avons observé une baisse d'activation de Fak significative tant chez les Caco-2/15 indifférenciées (Figure 24A; Figure 24D), les Caco-2/15 différenciées (Figure 24B; Figure 24D) et chez les HIEC (Figure 24C; Figure 24D) lorsqu'il y a présence de cytochalasine D ou que les cellules sont maintenues en suspension.

Lorsque l'activité kinase des TKs Src est inhibée par le PP2, l'activation de Fak diminue significativement seulement chez les cellules Caco-2/15 différenciées (Figure 24B ; Figure 24D). Quant à l'herbimycine A, elle cause aussi une chute d'activation de Fak chez les cellules Caco-2/15 différenciées (Figure 24B ; Figure 24D). Contrairement au PP2, l'herbimycine A cause une hausse significative d'activation de Fak chez les HIEC (Figure 24C ; Figure 24D). Comme nous le constatons, l'inhibition des TKs Src

Figure 24. *Activation relative de p125^{Fak} chez les cellules épithéliales intestinales lors de l'inhibition des TKs Src, de p125^{Fak} et de la signalisation intégrines-Fak. A-C : Analyses en Western blot représentatives de l'activation de la kinase p125^{Fak} chez les cellules Caco-2/15 indifférenciées (-2 PC) (A), Caco-2/15 différenciées (30 PC) (B) et HIEC-6 (C). Les cellules ont été cultivées en présence de 10% de FBS pour les Caco-2/15 et de 5% de FBS pour les HIEC-6. Lors de l'atteinte de confluence désirée, les cellules ont été incubées pendant 48 heures dans un milieu sans sérum seul (ctrl ; puits 1), en présence de PP2 20mM (PP2; puits 2), d'herbimycine A 10μM (HA; puits 3), de cytochalasine D 1μM (CD; puits 4) ou maintenues en suspension (Susp.; puits 5). Les cellules ont ensuite été lysées dans du tampon RIPA et s'en est suivi une immunoprécipitation de p125^{Fak}. 30μl d'immunoprécipitat ont été séparés par électrophorèse sur gel SDS-PAGE 7,5% sous des conditions réductrices, électrotransférés sur membrane de nitrocellulose et immunodétectés avec un anticorps spécifique de la forme active de Fak (p^{tyr397}p125^{Fak}). La détection de la quantité totale de p125^{Fak} immunoprécipitée a été effectuée avec l'anticorps ayant servi à l'immunoprécipitation, afin de normaliser la quantité de protéines dans chacun des puits. (D) Les bandes de protéines ont été numérisées, puis les niveaux relatifs d'activation de p125^{Fak} ont été évalués en établissant le rapport p^{tyr397}p125^{Fak}/p125^{Fak} en utilisant le logiciel Scion Image. Ces niveaux ont ensuite été comparés avec ceux des cellules contrôles X 100% (exprimé en % du contrôle). Chaque colonne représente la moyenne ± SEM (« standard error of the mean ») pour chaque traitement de chaque lignée cellulaire et ce, pour au moins 3 expériences distinctes (n≥3). Les différences significatives (0,001 ≤ p ≤ 0,05) entre les traitements et les contrôles sont indiquées par des astérisques (*).*



chez les cellules Caco-2/15 indifférenciées n'a aucun impact sur l'activation de Fak (Figure 24A ; Figure 24D).

Ces résultats suggèrent que chez les cellules Caco-2/15 indifférenciées et les HIEC, les TKs Src seraient plutôt des joueuses en aval de Fak et ne seraient pas impliquées dans l'activation de Fak. Toutefois chez les cellules Caco-2/15 différenciées, l'activation de Fak serait dépendante des TKs Src.

7. Les interactions entre les TKs Src et Fak peuvent être affectées par l'inhibition des TKs Src, de Fak ou de la signalisation intégrines-Fak.

Comme le suggère les résultats des deux sections précédentes (Sections 5 et 6), il y aurait des communications entre les TKs Src et Fak. Nous avons analysé si ces communications s'effectuent par des interactions directes entre Fak et les TKs Src. Nous avons d'abord effectué des immunoprécipitations de Fak. Par immunobuvardage, nous avons ensuite analysé s'il y avait co-immunoprécipitation des TKs Src et de Fak. Nous avons établis les niveaux relatifs de co-immunoprécipitation des TKs Src (i.e. TKs Src co-immunoprécipitée/quantité de Fak immunoprécipitée, comparé ensuite avec le rapport obtenu pour les cellules contrôles respectives X 100%).

Pour commencer, Src co-immunoprécipite avec Fak chez les cellules contrôles Caco-2/15 indifférenciées et différenciées (Figure 25A, puits 1; Figure 25B, puits 1) et chez les HIEC (Figure 25C, puits 1). Lorsque l'activité catalytique des TKs Src est inhibée par le

PP2 ou l'herbimycine A, il y a augmentation significative des co-immunoprécipitations de Src avec Fak et ce, peu importe la lignée cellulaire et le stade de différenciation (Figure 25D). Les interactions entre Src et Fak semblent affectées par l'activité des TKs Src. L'inhibition de Fak par la CD n'affecte les interactions entre Src et Fak que chez les cellules Caco-2/15 différenciées, en les augmentant significativement (Figure 25D). Par contre lorsque les cellules sont maintenues en suspension, il y a des augmentations significatives des co-immunoprécipitations tant chez les Caco-2/15 indifférenciées (Figure 25A; Figure 25D), chez les Caco-2/15 différenciées (Figure 25B; Figure 25D) que chez les HIEC (Figure 25C; Figure 25D). L'adhésion cellulaire semble affectée les interactions entre Fak et Src chez les cellules épithéliales intestinales. Chez les Caco-2/15 différenciées, les interactions semblent aussi être affectées par l'activation de Fak.

Tout comme pour Src, Fyn co-immunoprécipite avec Fak chez les cellules contrôles Caco-2/15 indifférenciées et différenciées (Figure 26A, puits 1; Figure 26B, puits 1) et chez les HIEC (Figure 26C, puits 1). Lorsqu'il y a inhibition de l'activité kinase des TKs Src par le PP2, il y a une augmentation significative des co-immunoprécipitations de Fyn et Fak chez les Caco-2/15 indifférenciées et chez les HIEC (Figure 26D). L'herbimycine A, quant à elle, augmente significativement les interactions entre Fyn et Fak chez les cellules Caco-2/15 différenciées ainsi que chez les HIEC (Figure 26D). L'inhibition de Fak par la cytochalasine D fait chuter significativement les co-immunoprécipitations seulement chez les cellules Caco-2/15 indifférenciées (Figure 26D). Par contre lorsque les cellules sont maintenues en suspension, les co-immunoprécipitations sont augmentées significativement chez les cellules Caco-2/15 indifférenciées et les HIEC (Figure 26D).

Figure 25. *Co-immunoprécipitation de p60^{Src} avec p125^{Fak} chez les cellules épithéliales intestinales lors de l'inhibition des TKs Src, de p125^{Fak} et de la signalisation intégrines-Fak.* **A-C :** Analyses en Western blot représentatives de co-immunoprécipitation de p60^{Src} lors d'immunoprécipitation de la kinase p125^{Fak} chez les cellules Caco-2/15 indifférenciées (-2 PC) (**A**), Caco-2/15 différenciées (30 PC) (**B**) et HIEC-6 (**C**). Les cellules ont été cultivées en présence de 10% de FBS pour les Caco-2/15 et de 5% de FBS pour les HIEC-6. Lors de l'atteinte de confluence désirée, les cellules ont été incubées pendant 48 heures dans un milieu sans sérum seul (ctrl ; puits 1), en présence de PP2 20mM (PP2; puits 2), d'herbimycine A 10μM (HA; puits 3), de cytochalasine D 1μM (CD; puits 4) ou maintenues en suspension (Susp.; puits 5). Les cellules ont été lysées dans du tampon RIPA et s'en est suivi une immunoprécipitation de p125^{Fak}. 30μl d'immunoprécipitat ont été séparés par électrophorèse sur gel SDS-PAGE 7,5% sous des conditions réductrices, électrotransférés sur membrane de nitrocellulose et immunodétectés avec un anticorps spécifique pour p60^{Src}. La détection de la quantité totale de p125^{Fak} immunoprécipitée a été effectuée avec l'anticorps ayant servi à l'immunoprécipitation, afin de normaliser la quantité de protéines dans chacun des puits. **(D)** Les bandes de protéines ont été numérisées, puis les niveaux relatifs de p60^{Src} co-immunoprécipitée ont été évalués en établissant le rapport p60^{Src}/p125^{Fak} en utilisant le logiciel Scion Image. Ces niveaux ont ensuite été comparés avec ceux des cellules contrôles X 100% (exprimé en % du contrôle). Chaque colonne représente la moyenne ± SEM (« standard error of the mean ») pour chaque traitement de chaque lignée cellulaire et ce, pour au moins 3 expériences distinctes (n≥3). Les différences significatives (0,001 ≤ p ≤ 0,05) entre les traitements et les contrôles sont indiquées par des astérisques (*).

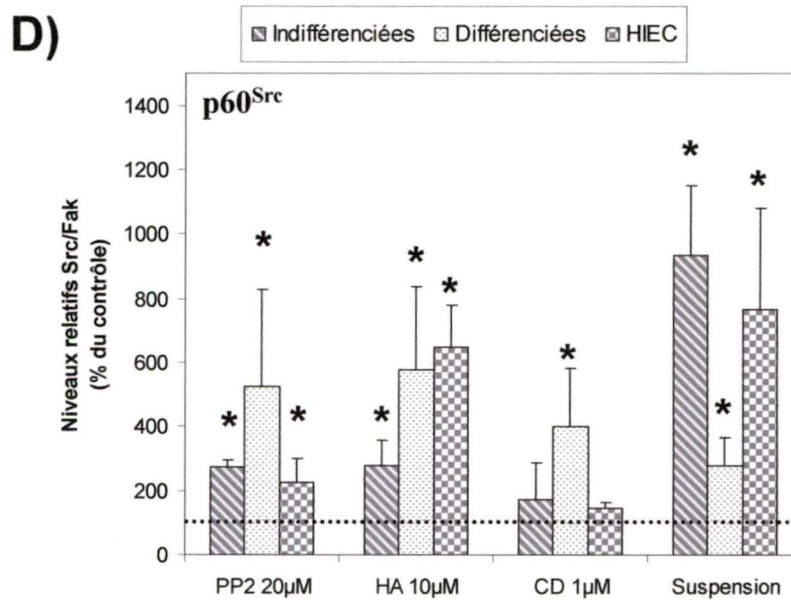
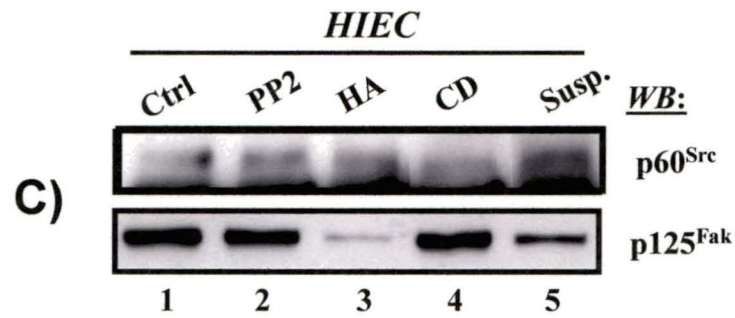
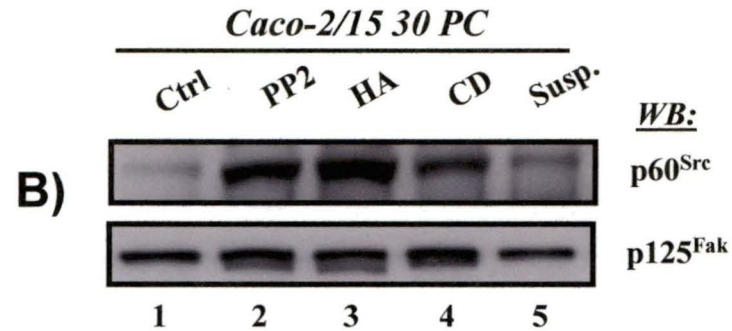
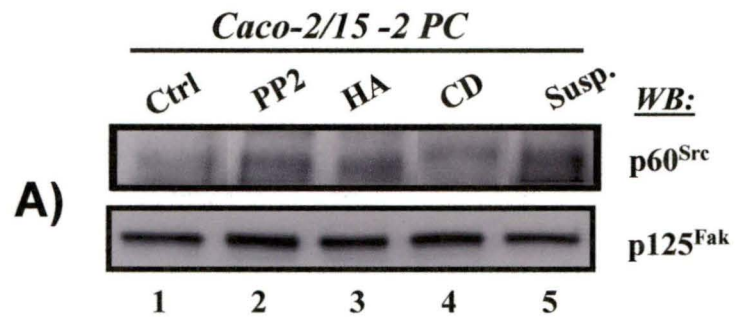


Figure 26. *Co-immunoprécipitation de p59^{Fyn} avec p125^{Fak} chez les cellules épithéliales intestinales lors de l'inhibition des TKs Src, de p125^{Fak} et de la signalisation intégrines-Fak.* **A-C :** Analyses en Western blot représentatives de co-immunoprécipitation de p59^{Fyn} lors d'immunoprécipitation de la kinase p125^{Fak} chez les cellules Caco-2/15 indifférenciées (-2 PC) (**A**), Caco-2/15 différenciées (30 PC) (**B**) et HIEC-6 (**C**). Les cellules ont été cultivées en présence de 10% de FBS pour les Caco-2/15 et de 5% de FBS pour les HIEC-6. Lors de l'atteinte de confluence désirée, les cellules ont été incubées pendant 48 heures dans un milieu sans sérum seul (ctrl ; puits 1), en présence de PP2 20mM (PP2; puits 2), d'herbimycine A 10μM (HA; puits 3), de cytochalasine D 1μM (CD; puits 4) ou maintenues en suspension (Susp.; puits 5). Les cellules ont été lysées dans du tampon RIPA et s'en est suivi une immunoprécipitation de p125^{Fak}. 30μl d'immunoprécipitat ont été séparés par électrophorèse sur gel SDS-PAGE 7,5% sous des conditions réductrices, électrotransférés sur membrane de nitrocellulose et immunodétectés avec un anticorps spécifique pour p59^{Fyn}. La détection de la quantité totale de p125^{Fak} immunoprécipitée a été effectuée avec l'anticorps ayant servi à l'immunoprécipitation, afin de normaliser la quantité de protéines dans chacun des puits. **(D)** Les bandes de protéines ont été numérisées, puis les niveaux relatifs de p59^{Fyn} co-immunoprécipitée ont été évalués en établissant le rapport p59^{Fyn}/p125^{Fak} en utilisant le logiciel Scion Image. Ces niveaux ont ensuite été comparés avec ceux des cellules contrôles X 100% (exprimé en % du contrôle). Chaque colonne représente la moyenne ± SEM (« standard error of the mean ») pour chaque traitement de chaque lignée cellulaire et ce, pour au moins 3 expériences distinctes (n≥3). Les différences significatives (0,001≤ p ≤ 0,05) entre les traitements et les contrôles sont indiquées par des astérisques (*).

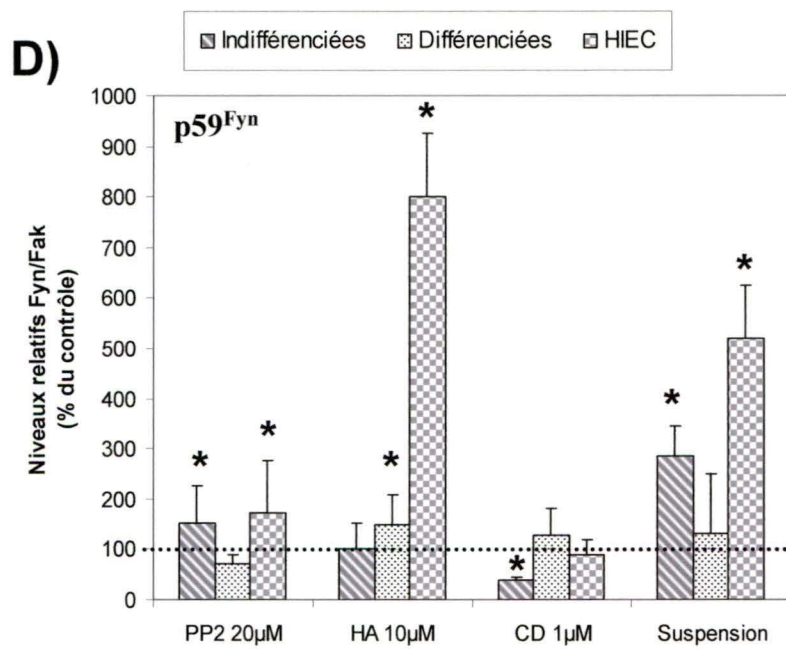
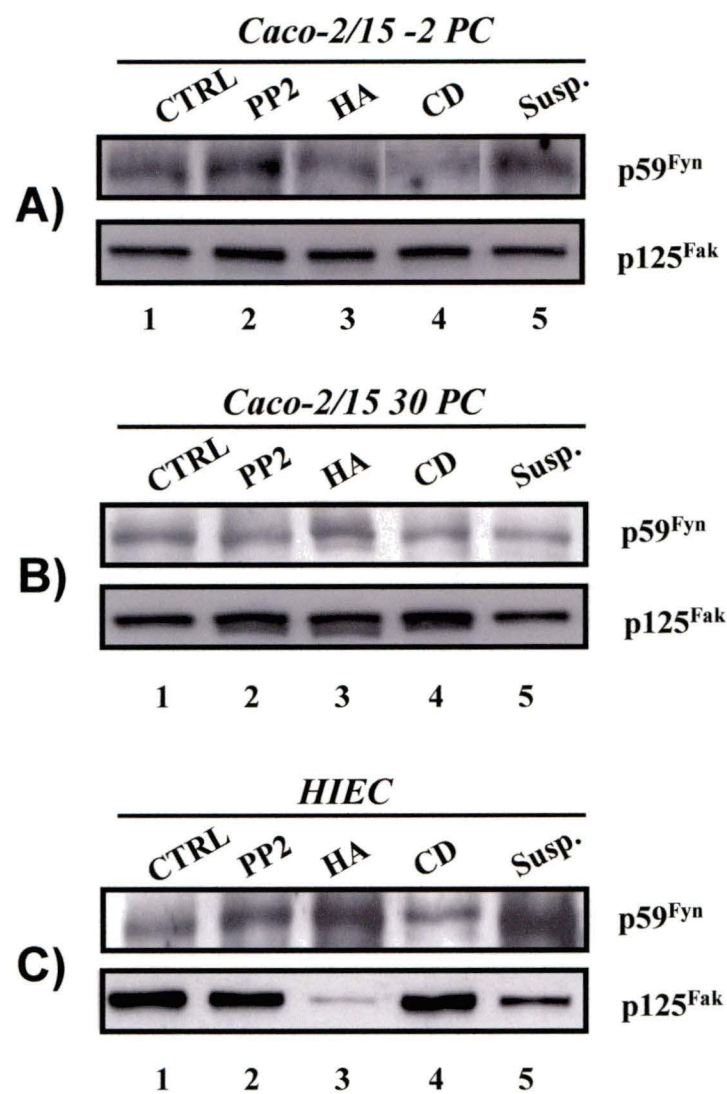
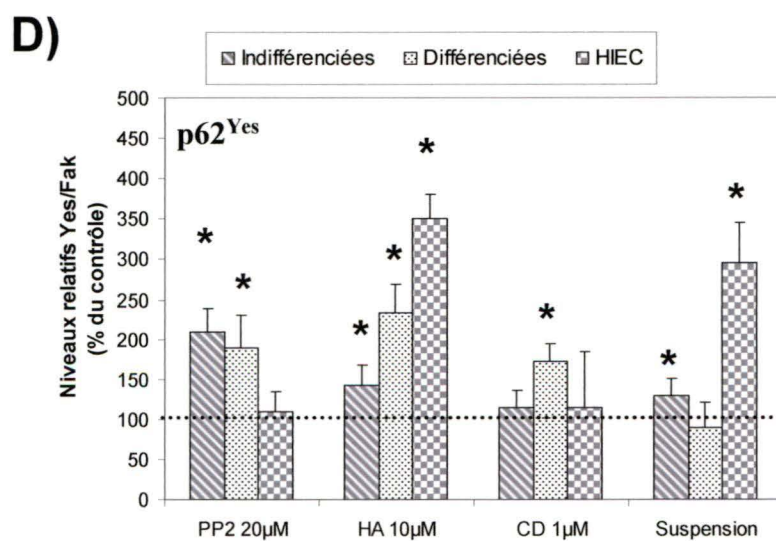
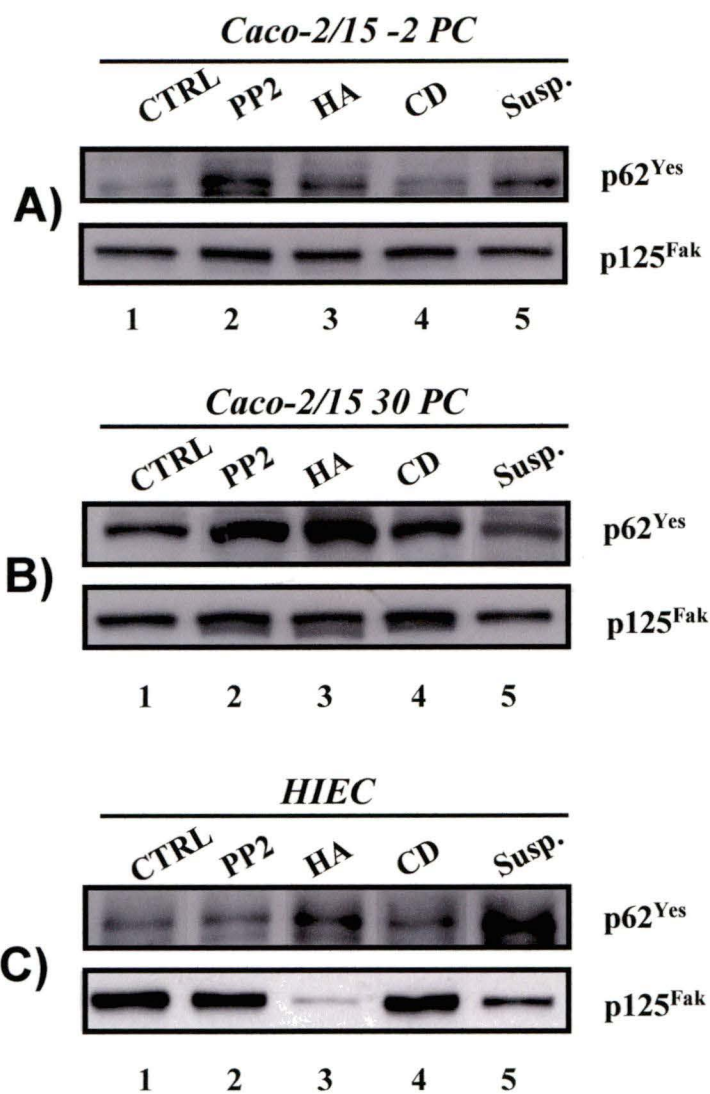


Figure 27. Co-immunoprécipitation de $p62^{Yes}$ avec $p125^{Fak}$ chez les cellules épithéliales intestinales lors de l'inhibition des TKs Src, de $p125^{Fak}$ et de la signalisation intégrines-Fak. **A-C** : Analyses en Western blot représentatives de co-immunoprécipitation de $p62^{Yes}$ lors d'immunoprécipitation de la kinase $p125^{Fak}$ chez les cellules Caco-2/15 indifférenciées (-2 PC) (**A**), Caco-2/15 différenciées (30 PC) (**B**) et HIEC-6 (**C**). Les cellules ont été cultivées en présence de 10% de FBS pour les Caco-2/15 et de 5% de FBS pour les HIEC-6. Lors de l'atteinte de confluence désirée, les cellules ont été incubées pendant 48 heures dans un milieu sans sérum seul (ctrl ; puits 1), en présence de PP2 20mM (PP2; puits 2), d'herbimycine A 10 μ M (HA; puits 3), de cytochalasine D 1 μ M (CD; puits 4) ou maintenues en suspension (Susp.; puits 5). Les cellules ont été lysées dans du tampon RIPA et s'en est suivi une immunoprécipitation de $p125^{Fak}$. 30 μ l d'immunoprécipitat ont été séparés par électrophorèse sur gel SDS-PAGE 7,5% sous des conditions réductrices, électrotransférés sur membrane de nitrocellulose et immunodétectés avec un anticorps spécifique pour $p62^{Yes}$. La détection de la quantité totale de $p125^{Fak}$ immunoprécipitée a été effectuée avec l'anticorps ayant servi à l'immunoprécipitation, afin de normaliser la quantité de protéines dans chacun des puits. **(D)** Les bandes de protéines ont été numérisées, puis les niveaux relatifs de $p62^{Yes}$ co-immunoprécipitée ont été évalués en établissant le rapport $p62^{Yes}/p125^{Fak}$ en utilisant le logiciel Scion Image. Ces niveaux ont ensuite été comparés avec ceux des cellules contrôles X 100% (exprimé en % du contrôle). Chaque colonne représente la moyenne \pm SEM (« standard error of the mean ») pour chaque traitement de chaque lignée cellulaire et ce, pour au moins 3 expériences distinctes ($n \geq 3$). Les différences significatives ($0,001 \leq p \leq 0,05$) entre les traitements et les contrôles sont indiquées par des astérisques (*).



L'activité des TKs Src, l'activité de Fak et l'adhésion cellulaire influencent donc distinctement les interactions entre Fyn et Fak selon l'état de différenciation et selon la lignée cellulaire des cellules épithéliales intestinales.

Comme les deux autres kinases, Yes co-immunoprécipite avec Fak chez les cellules contrôles peu importe l'état de différenciation et la lignée cellulaire (Figure 27A, puits 1; Figure 27B, puits 1; Figure 27C, puits 1). L'usage du PP2 augmente significativement les interactions entre Yes et Fak chez les cellules Caco-2/15 indifférenciées et différenciées (Figure 27D). L'herbimycine A, quant à elle, augmentent les co-immunoprécipitations entre Yes et Fak chez les cellules Caco-2/15 indifférenciées et différenciées ainsi que chez les HIEC (Figure 27D). Les interactions sont donc affectées par l'activité des TKs Src. Pour ce qui est de l'effet de la cytochalasine D, elle augmente significativement les co-immunoprécipitations de Yes avec Fak seulement chez les cellules Caco-2/15 différenciées (Figure 27D). Chez les cellules Caco-2/15 indifférenciées et les HIEC, les interactions sont augmentées significativement lorsque les cellules sont maintenues en suspension (Figure 27D). Les interactions entre Yes et Fak seraient affectées par l'activation de Fak chez les cellules différenciées et par l'adhésion cellulaire chez les cellules indifférenciées et les HIEC.

Bien que les trois kinases co-immunoprécipitent avec Fak, les interactions entre Fak et les TKs Src sont influencées différemment par l'activité des TKs Src, l'activation de Fak et l'adhésion cellulaire et ce, selon l'état de différenciation et la lignée des cellules épithéliales intestinales.

8. Les cellules HIEC et l'herbimycine A.

Nous avons observé que les immunoprécipitations effectuées chez les cellules HIEC traitées avec de l'herbimycine A montraient toutes une diminution de la quantité totale de kinase immunoprécipitée. En effet, la quantité de kinase immunoprécipitée chez les HIEC traitées à l'herbimycine A (HA) est toujours inférieure à celle retrouvée chez les HIEC contrôles et/ou les HIEC ayant subi d'autres traitements. Ceci est observé tant pour les TKs Src (Figure 18A, puits 9; Figure 19A, puits 9; Figure 20A, puits 9) que pour Fak (Figure 24C, puits 3; Figure 25C puits 3; Figure 26C, puits 3; Figure 27C, puits 3). Il semblerait donc que l'herbimycine A pourrait affecter soit la synthèse protéique ou encore la stabilité des protéines chez les HIEC. Nous n'avons toutefois pas observé de diminutions chez les Caco-2/15 indifférenciées et différenciées lorsqu'elles étaient traitées à l'herbimycine A.

IV – DISCUSSION

Dans cette étude, nous avons examiné la question de l'implication des différentes TKs Src dans la survie selon l'état de différenciation des cellules épithéliales intestinales humaines. Nous nous sommes intéressés plus particulièrement aux différences potentielles entre les trois TKs Src dans les mécanismes de régulation de la survie et/ou de l'apoptose/anoïkose impliquant la signalisation intégrines-Fak. Nous avons ainsi analysé la contribution de Src, Fyn et Yes dans la survie et dans la signalisation intégrines-Fak selon l'état de différenciation des cellules épithéliales intestinales. Tout d'abord, nous constatons l'existence de profils distincts d'expression et d'activation des TKs Src au cours de la différenciation des cellules épithéliales intestinales. De plus, les TKs Src sont impliquées dans la survie à tous les stades de différenciation. Toutefois, cette implication est caractérisée par des impacts sur les niveaux d'activation des trois kinases qui sont propres à chacune des kinases et aussi selon l'état de différenciation des cellules épithéliales intestinales. Pour ce qui est de leur participation dans les cassettes de signalisation intégrines-Fak, les TKs Src peuvent être dépendantes ou indépendantes de cette signalisation selon la TK Src et l'état de différenciation des cellules épithéliales intestinales. Pour les interactions directes entre les différentes TKs Src et Fak, elles sont régulées en fonction de la kinase et l'état de différenciation des cellules épithéliales intestinales. Enfin, lors de l'inhibition de l'activité des TKs Src, de Fak et/ou de la signalisation intégrines-Fak, il y aurait potentiellement un ou des mécanismes compensatoires d'activation des TKs Src. Finalement, les cellules HIEC sont divergentes des cellules Caco-2/15 indifférenciées, probablement à cause de la nature des cellules

(normales vs cancéreuses) et aussi puisque les HIEC sont plus indifférenciées que les Caco-2/15. Tous ces résultats suggèrent que les TKs Src sont exprimées, activées et régulées distinctement selon l'état de différenciation et la lignée des cellules épithéliales intestinales humaines, notamment dans les mécanismes de survie passant par les cassettes de signalisation intégrines-Fak.

1. Distinctions dans les profils d'expression et d'activation entre les trois TKs Src selon l'état de différenciation des cellules épithéliales intestinales.

Chez plusieurs types cellulaires, l'expression d'une TK Src varie selon l'état de différenciation cellulaire (Thomas et Brugge, 1997; Danielian, 1993; Parsons et Parsons, 2004). Ainsi, il y a une augmentation d'expression de Src lors de la différenciation terminale des monocytes (Barnekow et Gessler, 1986) et des neurones (Cartwright et al., 1987; Brugge et al., 1985), mais une diminution d'expression de Src est observée chez les cellules myogéniques (Laprise et al., 2002). Des différences sont aussi observées entre les patrons d'expression des diverses TKs Src exprimées (Laprise et al., 2002; Summy et al, 2003b). Chez les cellules myogéniques, l'expression de Src diminue au cours de la différenciation, tandis que celle de Yes et de Fyn augmente (Laprise et al., 2002). Au cours de l'embryogénèse, il y a une diminution d'expression de Src et une augmentation de Yes chez les cellules neuronales (Sudol et al., 1988). Nous avons analysé si de telles distinctions étaient observées chez les cellules épithéliales intestinales au cours de leur différenciation. Comme nos résultats le démontrent, chaque kinase possède un profil d'expression qui est différent de celui des deux autres kinases, mais seule Src en possède

un qui diffère significativement entre les états indifférenciés et différenciés des cellules Caco-2/15. Ainsi, l'expression de Src pourrait être potentiellement importante, entre autre, pour la différenciation terminale des cellules épithéliales intestinales, tout comme elle l'est chez les monocytes (Barnekow et Gessler, 1986) et les neurones (Cartwright et al., 1987; Brugge et al., 1985). Toutefois, il ne faut pas exclure l'hypothèse que Fyn et Yes pourraient avoir des rôles à jouer au cours du processus de différenciation des cellules épithéliales intestinales, mais ceci n'a jamais été démontré. Cette différence d'expression de Src pourrait être importante pour la survie cellulaire. Enfin, l'expression de Fyn et celle de Src chez les cellules HIEC sont divergentes à celles retrouvées chez les cellules Caco-2/15 indifférenciées. Ces résultats peuvent s'expliquer par la nature des cellules. En effet, les cellules d'origine cancéreuse, comme les Caco-2/15, sont reconnues pour avoir des niveaux d'expression des TKs Src plus élevés que ceux retrouvés chez les cellules normales, telles les HIEC (Summy et Gallick, 2003; Playford et Schaller, 2004; Windham et al., 2002).

Bien qu'une kinase soit exprimée, son profil d'activation relative ne suit pas nécessairement son profil d'expression. Un exemple type chez les cellules Caco-2/15 est l'expression de Fak qui augmente au cours de la différenciation, mais dont l'activation relative chute avec celle-ci (Gauthier et al., 2001; Lévy et al., 1998). Contrairement à ce qui a été observé pour l'expression, ici c'est Fyn et Yes qui possèdent des profils distincts, car l'activation relative de chacune augmente avec la différenciation des cellules épithéliales intestinales. L'activation relative de Src, contrairement à son expression, ne varie pas entre les états indifférenciés et différenciés. Ces résultats nous

démontrent que lors d'études concernant des kinases, il ne faut pas se limiter à l'expression, mais il faut aussi étudier l'activation puisque les deux peuvent présenter des patrons divergents. Par le passé, il a été démontré chez les cellules Caco-2/15, que de telles distinctions étaient observées pour certaines kinases impliquées dans les mécanismes de régulation de la survie. Bien que l'expression de Fak et celle des MAPK p42^{Erk-2}/p44^{Erk-1} augmentent au cours de la différenciation, leurs activations diminuent (Gauthier et al., 2001; Dufour et al., 2004; Lévy et al., 1998). Finalement, tout comme pour l'expression, l'activation de Fyn et de Src chez les cellules HIEC étaient différentes de celles retrouvées chez les cellules Caco-2/15 indifférenciées. Ces résultats peuvent s'expliquer par la nature des cellules. Il y a non seulement augmentation d'expression des TKs Src chez les cellules cancéreuses, mais aussi augmentation de leur activation et de leur activité (Summy et Gallick, 2003; Playford et Schaller, 2004; Windham et al., 2002).

Avec l'étude de l'expression et de l'activation des trois TKs Src, les résultats laissent présager que, selon l'état de différenciation des cellules épithéliales intestinales, il y aurait potentiellement des rôles propres à chacune des TKs Src, notamment dans les mécanismes de régulation de la survie. Toutefois, il ne faut pas négliger l'hypothèse d'une certaine coopération et/ou compensation possible entre les trois TKs Src. Finalement, il semble y avoir des différences entre les cellules indifférenciées selon leur nature, soit normale (HIEC) ou cancéreuse (Caco-2/15).

2. Implications des TKs Src dans les mécanismes de survie des cellules épithéliales intestinales, mais des susceptibilités à entrer en apoptose distinctes selon l'état de différenciation.

Par le passé, plusieurs études ont démontré que les TKs Src, de par leur activité kinase, pouvaient être impliquées dans la survie de nombreux types cellulaires (Thomas et Brugge, 1997; Parsons et Parsons, 2004; Laprise et al., 2002; Xing et al., 2001; Wadhawan et al., 2004; Jost et al., 2001). Les TKs Src sont ainsi impliquées dans la survie, par exemple, des cellules myogéniques (Laprise et al., 2001), des ostéoclastes (Xing et al., 2001), des plaquettes (Wadhawan et al., 2004) et des kératinocytes (Jost et al., 2001). Leur implication dans la survie dépend de plusieurs mécanismes qui varient selon le type cellulaire (Laprise et al., 2001; Jost et al., 2001; Loza-Coll et al., 2002). Dans cette étude, nous avons analysé si la survie des cellules épithéliales intestinales humaines dépendait de l'activité tyrosine kinase des TKs Src et ce, selon leur état de différenciation. L'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques inhibant cette activité, soit le PP2 ou l'herbimycine A, a permis de montrer qu'il y a une augmentation de la susceptibilité à entrer en apoptose peu importe le stade de différenciation des cellules épithéliales intestinales. Cela suggère donc que une ou des TKs Src seraient potentiellement impliquées dans la survie de ces cellules à tous les stades de différenciation. Cette étude montre d'ailleurs que les TKs Src sont impliquées dans la survie des cellules épithéliales intestinales normales humaines (HIEC) et pas seulement chez les cellules épithéliales intestinales cryptales normales de rats IEC-18 (Loza-Coll et al., 2002). Toutefois, nos résultats montrent que la susceptibilité à entrer en apoptose est

distincte selon l'inhibiteur utilisé. En effet, l'inhibition par le PP2 a un impact plus marqué (index apoptotiques relatifs plus élevés) sur la survie des cellules Caco-2/15 indifférenciées, que sur la survie des Caco-2/15 différenciées et celle des HIEC, qui sont affectées similairement. Par contre, l'inhibition par l'herbimycine A affecte grandement les HIEC, suivie des Caco-2/15 indifférenciées et finalement des Caco-2/15 différenciées, qui sont les moins touchées. Chez les Caco-2/15, l'activité kinase des TKs Src semble plus importante pour la promotion de la survie des cellules indifférenciées que pour celle des cellules différenciées. En effet, la perte de cette activité rend les cellules indifférenciées plus susceptibles à entrer en apoptose que les cellules différenciées. Ceci est d'ailleurs contraire à ce qui est normalement observé *in vivo* et lorsqu'il y a induction d'anoïkose *in vitro* (ex : CD ou Susp.) puisque les cellules épithéliales intestinales différenciées sont normalement plus susceptibles à entrer en apoptose que les cellules indifférenciées (Vachon et al., 2000; Gauthier et al., 2001; Vachon et al., 2002; Dufour et al., 2004). Les TKs Src seraient potentiellement impliquées distinctement dans les mécanismes de régulation de la survie (Gauthier et al., 2001; Vachon et al., 2002; Dufour et al., 2004) selon l'état de différenciation. Par exemple, l'activité des TKs Src, tout comme la voie de la PI3-K/Akt, seraient plus importantes pour la survie des Caco-2/15 indifférenciées que des différenciées (Gauthier et al., 2001). Il ne faut toutefois pas négliger la présence chez les cellules épithéliales intestinales de d'autres TKs Src pouvant être inhibées, telle que Rak (Cance et al., 1994). Celles-ci pourraient aussi être impliquées dans la survie.

Les deux inhibiteurs utilisés sont des inhibiteurs spécifiques de tous les TKs Src (Hanke et al., 1996; Bain et al., 2003). Le PP2 agit selon un mécanisme compétitif direct avec l'ATP pour la liaison au site de liaison de ce dernier qui se trouve dans le domaine catalytique des TKs Src (Hanke et al., 1996; Bain et al., 2003). L'herbimycine A, quant à elle, lie irréversiblement les groupe sulfhydryles se trouvant au site de liaison de l'ATP et est ainsi un compétiteur direct (Park et al., 1991). Les différences observées entre les deux inhibiteurs s'expliquent par une affinité différente des deux inhibiteurs pharmacologiques pour les diverses TKs Src (Reinehr et al., 2004) impliquées potentiellement dans la survie des cellules épithéliales intestinales. Toutefois, peu d'études ont porté sur les différences d'affinité entre chacune des TKs Src pour les deux inhibiteurs. Pour le PP2, seuls les EC_{50} de Lck, Fyn et Hck sont déterminés et sont tous de 5 nM (Hanke et al., 1996). Pour ce qui est de l'herbimycine A, seuls les EC_{50} de v-Src (12 μ M), de c-Src (70 nM) sont déterminés. Donc les EC_{50} pour les deux inhibiteurs ne sont pas encore tous déterminés. De plus, bien que chaque inhibiteur soit reconnu pour être spécifique aux TKs Src, ils ne le sont pas totalement car ils peuvent affecter directement l'activité kinase de protéines impliquées dans des voies de signalisation importantes pour la survie des cellules épithéliales intestinales, telles les MAPK $p42^{Erk-2}/p44^{Erk-1}$ et Akt (Bain et al., 2003). Ces protéines sont d'ailleurs connues pour leurs implications dans les mécanismes de régulation de la survie selon l'état de différenciation des cellules épithéliales intestinales (Gauthier et al., 2001). Dans le cadre de cette présente étude, nous n'avons toutefois pas étudié les effets sur ces voies de signalisation, mais ceci devra être fait dans le futur. Enfin, la différence observée quant à la susceptibilité des HIEC selon l'inhibiteur utilisé peut s'expliquer par le mécanisme

d'action de l'herbimycine A. Elle inhibe la protéine de choc thermique Hsp-90, une protéine chaperonne qui assure une bonne conformation aux protéines (Jones et al., 2004). Cette inhibition mène à la déstabilisation de protéines, telles que Akt et Raf-1 (Jones et al., 2004), et/ou en l'accumulation de protéines de conformation incorrecte dans le réticulum endoplasmique (Jones et al., 2004; Lawson et al., 1998). Des protéines importantes pour la survie des HIEC, comme par exemple Fak (Harnois et al., 2004), pourraient ainsi être affectées dans leur expression, où l'on note une baisse d'expression, bien que l'expression relative n'est pas été évaluée (voir Résultats). L'effet chez les Caco-2/15 est moins marqué que chez les HIEC, puisqu'il n'y a pas de baisses des niveaux protéiques notées lors des immunoprécipitations (voir Résultats-Section 8).

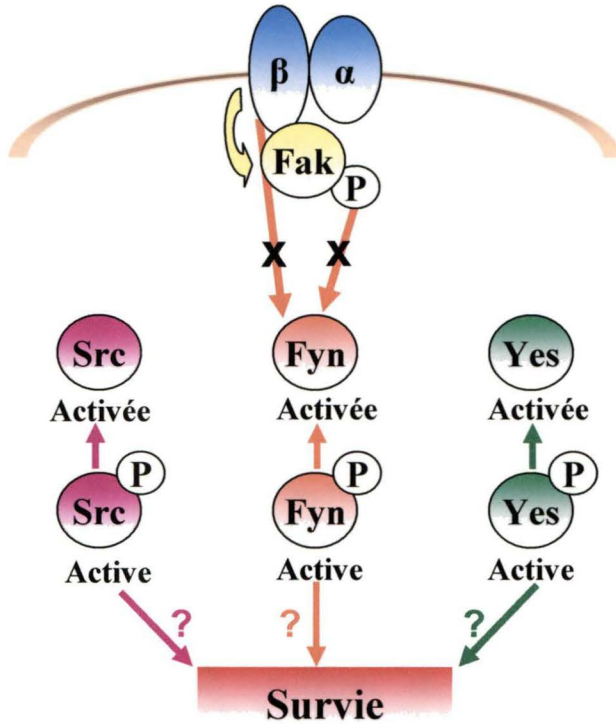
2.1 Lors de l'inhibition de leur activité kinase, l'activation de chacune des TKs Src est affectée distinctement selon l'état de différenciation.

Afin d'approfondir l'implication des TKs Src dans la survie des cellules épithéliales intestinales, nous avons analysé leurs niveaux d'activation lors de l'inhibition de leur activité kinase (Figure 28). Comme mentionné précédemment, les inhibiteurs n'ont pas la même affinité pour chaque TKs Src (Reinehr et al., 2004). L'inhibition de l'activité tyrosine kinase par le PP2 ou l'herbimycine A peut ainsi avoir des impacts distincts selon la kinase, pouvant même affecter différemment les mécanismes de régulation de la survie. L'analyse des niveaux d'activation de Src, Fyn et Yes lors de l'inhibition de l'activité tyrosine kinase par le PP2 et l'herbimycine A montre que les trois sont affectées de façon variant selon l'état de différenciation et la lignée cellulaire. De plus, comme

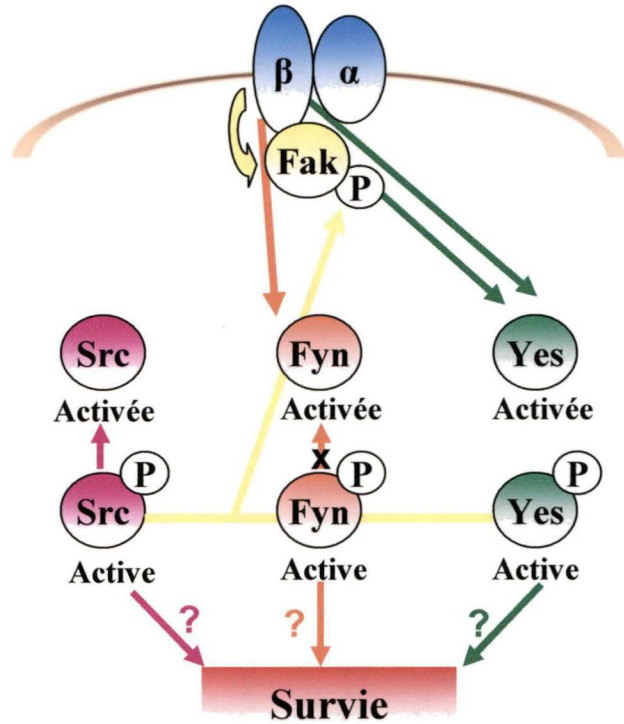
Figure 28. *Les mécanismes d'activation sont distincts pour les trois TKs Src et pour Fak selon l'état de différenciation et la lignée des cellules épithéliales intestinales.*

L'activation de chacune des TKs Src (Activée) est régulée par plusieurs mécanismes. En effet, elle peut dépendre de l'activité kinase des TKs Src (Active), de l'activation de Fak (P-Fak) et de la signalisation intégrines-Fak (Intégrines β). Ces mécanismes influencent distinctement l'activation de chacune des TKs Src selon l'état de différenciation et selon la lignée cellulaires. De plus, l'activation de certaines TKs Src sont indépendantes de certains mécanismes puisque lorsque ceux-ci sont inhibés, il y a une hausse d'activation de notée, suggérant des mécanismes compensatoires d'activation.

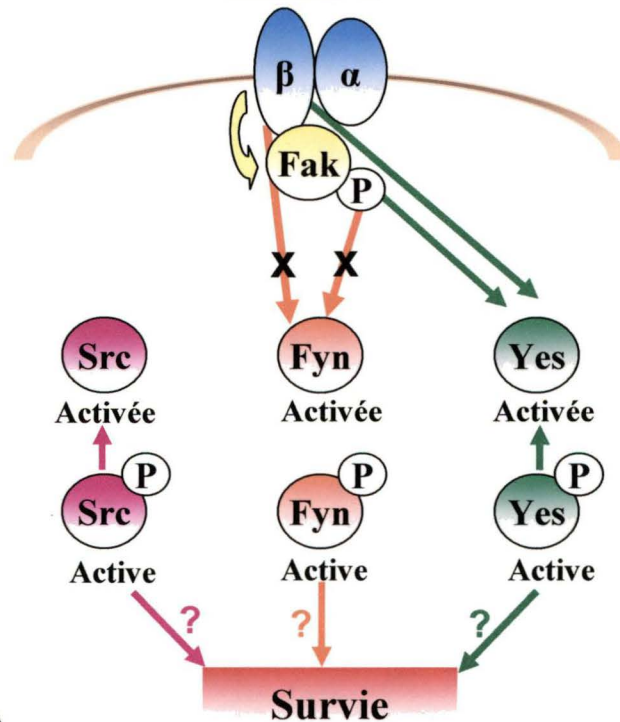
Caco-2/15 Indifférenciées



Caco-2/15 Différenciées



HIEC



Légende

A → B: activation de B dépendante de A

A ✗ B: activation de B indépendante de A

nous nous y attendions, les deux inhibiteurs peuvent affecter différemment les niveaux d'activation d'une même TK Src. Chez les cellules Caco-2/15 indifférenciées, bien que les niveaux d'activation des trois TKs Src diminuent en présence de PP2, uniquement celui de Fyn diminue en présence d'herbimycine A. Chez les cellules Caco-2/15 différenciées, seule l'activation de Src en présence de PP2 est diminuée. De plus, il y a même une hausse d'activation de Fyn en présence d'herbimycine A. Pour les HIEC, le PP2 fait diminuer l'activation de Src et de Yes, mais l'herbimycine A n'affecte à la baisse que l'activation de Yes. Ces résultats démontrent que les niveaux d'activation des TKs Src sont affectés distinctement selon la kinase, l'état de différenciation et la lignée cellulaire lors de l'inhibition de l'activité tyrosine kinase par le PP2 et l'herbimycine A. À ce moment-ci, avec seulement les changements observés dans les niveaux d'activation, nous ne pouvons pas déterminer quelle(s) TK(s) Src est (sont) impliquée(s) dans les mécanismes de survie spécifiquement à chacun des stades de différenciation et selon la lignée cellulaire. Toutefois, les baisses d'activation observées étaient attendues puisque le PP2 et l'herbimycine A sont reconnus pour leur efficacité d'inhibition de l'activation des TKs Src (Hanke et al., 1996; Bain et al., 2003). Notre surprise a plutôt été les niveaux d'activation de certaines TKs Src qui ne changent pas et qui même augmentent lors de l'inhibition de l'activité catalytique par le PP2 ou l'herbimycine A. Ceci laisse entrevoir la possibilité de mécanismes compensatoires pour l'activation des TKs Src. Une récente étude a montré que les cellules IEC-18, des cellules épithéliales intestinales cryptales de rat, traitées avec du PP2 présentent une augmentation de la phosphorylation de la tyrosine 418 de Src lors d'une stimulation par l'angiotensine II. Il n'y a toutefois pas d'augmentation de son activité kinase, car le PP2 reste logé dans le site catalytique (Wu

et al., 2005). Ceci est contraire à ce qui avait toujours été énoncé, i.e. que la phosphorylation de la tyrosine se trouvant dans le site catalytique(ex : tyr418 pour c-Src) était en corrélation directe avec l'activité kinase des TKs Src (Thomas et Brugges, 1997 ; Boggon et Eck, 2004). Une tyrosine kinase, insensible au PP2, serait stimulée par les agonistes des récepteurs couplés aux protéines G et viendrait phosphoryler la tyrosine 418. Il n'y aurait donc pas d'autophosphorylation (Wu et al., 2005). Dans le laboratoire, ils ont donc commencé à analyser l'activité kinase de nos trois TKs Src. Elles démontrent toutes une chute d'activité kinase lors de l'utilisation d'herbimycine A peu importe l'état de différenciation et la lignée cellulaire. Aucun résultat n'a été obtenu avec le PP2 jusqu'à maintenant (Demers et Vachon, données non publiées). D'autres mécanismes compensatoires menant à l'activation de certaines TKs Src sont possibles comme des interactions directes avec des sous-unités d'intégrines (Arias-Salgado et al., 2003) ou encore des interactions avec les cavéolines (Duxbury et al., 2004).

Les TKs Src semblent donc impliquées dans la survie des cellules épithéliales intestinales, mais de façon apparemment distincte selon la kinase, l'état de différenciation et la lignée cellulaire. En effet, la susceptibilité à entrer en apoptose et les impacts sur niveaux d'activation des différentes TKs Src sont différents selon l'état de différenciation, la lignée cellulaire et l'inhibiteur de l'activité kinase des TKs Src utilisé. Toutefois, avec l'utilisation d'inhibiteur seulement, aucune implication spécifique d'une TK Src en particulier à un stade de différenciation précis n'a pu être démontrée avec cette étude, car il n'y a aucune corrélation entre une kinase et un état de différenciation. D'ailleurs, notre but était de seulement vérifier la différence d'implication des TKs Src,

en général, selon l'état de différenciation et non de déterminer le rôle de chacune selon les états de différenciation. Pour ce faire, il faudra inhiber plus spécifiquement chacune des kinases, par exemple en utilisant des mutants dominants négatifs, pour mieux préciser le rôle de chaque TK Src dans la promotion de la survie et/ou dans la suppression de l'apoptose. Bien que nous nous attendions à ce que les changements observés dans les niveaux d'activation se reflètent dans l'activité kinase, nous devons toutefois le confirmer en analysant les activités kinases.

3. Les TKs Src et la signalisation intégrines-Fak chez les cellules épithéliales intestinales.

3.1 L'activation de Fak dépend de la signalisation intégrines-Fak.

Pour survivre, une cellule épithéliale doit adhérer à sa matrice extracellulaire via les intégrines (Meredith et al., 1993 ; Frisch et Francis, 1994). Le recrutement et l'activation de la tyrosine kinase Fak est un événement précoce qui survient suite au regroupement («clustering») des intégrines (Giancotti et Ruoslahti, 1999). Fak peut être directement recrutée par le domaine cytoplasmique de la sous-unité β des intégrines (Cornillon et al., 2003; Kumar, 1998 ; Schaepfer et Hunter, 1998). Il y a alors autophosphorylation sur le résidu tyrosine 397. Nous avons analysé l'impact sur les niveaux d'activation de Fak de la cytochalasine D, un inhibiteur de l'activation de Fak (Lipfert et al., 1992 ; Barberis et al., 2000 ; Gauthier et al., 2001; Vachon et al., 2002 ; Harnois et al., 2004 ; Dufour et al., 2004), ainsi que l'effet du maintien des cellules en suspension, qui inhibe la signalisation

intégrines-Fak. (Frisch, 1999; Vachon et al., 2002 ; Harnois et al., 2004 ; Dufour et al., 2004). Les baisses d'activation obtenues confirment ce qui avait été préalablement observé chez les cellules épithéliales intestinales peu importe le stade de différenciation et la lignée cellulaire (Gauthier et al., 2001, Vachon et al., 2002; Harnois et al., 2004; Vachon et al., 2004). L'activation de Fak dépend de la signalisation intégrines-Fak à tous les stades de différenciation des cellules épithéliales intestinales (Figure 28).

3.2 L'activation de Fak implique l'activité kinase des TKs Src distinctement selon l'état de différenciation des cellules épithéliales intestinales.

L'activité catalytique des TKs Src est requise pour médier l'adhésion cellulaire impliquant les interactions intégrines-matrice extracellulaire (Li et al., 2002). De plus, les TKs Src peuvent phosphoryler directement Fak sur son résidu tyrosine 397, ne nécessitant alors pas d'autophosphorylation de la part de Fak (Toutant et al., 2000), en plus des autres tyrosines de Fak phosphorylées par les TKs Src suite à l'autophosphorylation de Fak sur son résidu tyrosine 397 (Calalb et al., 1995; Cornillon et al., 2003). Nous avons donc analysé l'impact de la perte de l'activité catalytique des TKs Src sur les niveaux d'activation de Fak chez les cellules épithéliales intestinales selon l'état de différenciation. Nos résultats montrent que les TKs Src peuvent mener à l'activation de Fak chez les Caco-2/15 différenciées. Toutefois l'activation de Fak semble indépendante de l'activité kinase des TKs Src chez les Caco-2/15 indifférenciées et chez les HIEC, ce qui est en accord avec la littérature. En effet, les TKs Src se lieraient après l'autophosphorylation de Fak sur la tyrosine 397 (Schaller et al., 1994 ; Schlaepfer et al.,

1994; Cornillon et al., 2003; Cobb et al., 1994; Xing et al., 1994; Levy et al., 1998). L'augmentation d'activation de Fak notée chez les HIEC en présence d'herbimycine A est probablement due au mécanisme d'action de l'herbimycine A (Hsp-90) qui affecte la stabilité des protéines (Jones et al., 2004; Lawson et al., 1998). Fak serait alors moins synthétisée, mais le peu qu'il y a serait activée. Les mécanismes d'activation de Fak impliquant l'activité kinase des TKs Src sont distincts selon l'état de différenciation des cellules épithéliales (Figure 28). Ainsi chez les cellules épithéliales intestinales, les TKs Src seraient situées en amont et en aval de l'activation de Fak chez les cellules différenciées, mais elles ne le seraient qu'en aval chez les cellules indifférenciées.

3.3 L'activation des TKs Src est dépendante ou non de Fak et/ou de la signalisation intégrines-Fak distinctement selon l'état de différenciation.

Suite à l'autophosphorylation de Fak sur le résidu tyrosine 397, ceci permet le recrutement par Fak de TKs Src via le domaine SH2 de ces dernières (Schaller et al., 1994 ; Schlaepfer et al., 1994; Cornillon et al., 2003). Il y a alors bris des interactions intramoléculaires au sein des TKs Src et déphosphorylation de leur tyrosine régulatrice (ex :Tyr 527). Ceci mène à l'activation des TKs Src, qui s'autophosphorylent sur la tyrosine 416 (chez c-Src) (Playford et Schaller, 2004; Thomas et Brugge, 1997; Boggon et Eck, 2004). L'analyse des niveaux d'activation des TKs Src lors des baisses d'activation de Fak causées par l'inhibition de Fak seule (+CD) ou par l'inhibition de la signalisation intégrines-Fak (Susp.) démontrent que les niveaux d'activation des TKs Src peuvent être affectés ou non et ce, selon la kinase, l'état de différenciation et la lignée

cellulaire (Figure 28). Ainsi, les implications potentielles des TKs Src dans les mécanismes de régulation de la survie passant par Fak et la signalisation intégrines-Fak sont distinctes selon la kinase, l'état de différenciation et la lignée cellulaire. À notre grande surprise, l'activation des TKs Src ne dépend pas de Fak ni de la signalisation intégrines-Fak pour les trois TKs Src chez les Caco-2/15 indifférenciées. Chez les cellules Caco-2/15 indifférenciées, les TKs Src ne seraient donc pas impliquées dans l'activation des voies de signalisation qui promouvoient la survie via l'activation de Fak comme la voie de la PI3-K/Akt-1 (Gauthier et al., 2001; Vachon et al., 2002; Dufour et al., 2004). Toutefois, elles pourraient quand même promouvoir la survie, mais de façon Fak-indépendante, puisque les TKs Src peuvent activer directement Akt (Jiang et Qiu, 2003; Kohn et al., 1996; Windham et al., 2002). Chez les Caco-2/15 différenciées, l'activation de Fyn et celle de Yes sont dépendantes de la signalisation intégrines-Fak, mais seule l'activation de Yes est dépendante de l'activation de Fak. Ceci suggère donc que l'activation de Fyn s'effectue par une interaction directe avec les intégrines via son domaine SH3 (Arias-Salgado et al., 2003) et est ainsi indépendante de Fak. Fyn et Yes pourraient activer des voies de signalisation impliquées dans les mécanismes de survie des cellules épithéliales intestinales différenciées et qui sont dépendantes de la signalisation intégrines-Fak comme la voie de la PI3-K/Akt et la voie MEK/Erk (Gauthier et al., 2001; Windham et al., 2002; Loza-Coll et al., 2002). Pour ce qui est des HIEC, seule l'activation de Yes est dépendante de Fak et de la signalisation intégrines-Fak. Yes pourrait participer à l'activation de la voie de la PI3-K, qui promouvoit la survie des cellules HIEC (Harnois et al., 2004; Gauthier et al., 2001), via la signalisation intégrines-Fak (Summy et al., 2003a) ou par une interaction directe entre la sous-unité

p85 de la PI3-K et Yes (Summy et al., 2003a; Summy et al., 2003b). Tout comme chez les Caco-2/15 indifférenciées, il y a une suractivation de Fyn dans les deux situations (+CD et Susp.), laissant encore présager des mécanismes d'activation compensatoires (ex; interaction directe avec une intégrine, activation par une tyrosine kinase externe, activation via les cavéolines (voir Section 2.1 pour les détails)). Ces hausses d'activation pourraient mener à l'activation de voies induisant l'anoïkose lorsque Fak ou que la signalisation intégrines-Fak est inhibée. Par exemple, la voie des p38, plus particulièrement p38 β , pourrait être activée puisqu'elle induit l'anoïkose chez les HIEC et les Caco-2/15 indifférenciées (Vachon et al., 2002; Harnois et al., 2004) et que son inhibition par le SB202190 diminue l'apparition de la dégradation d'ADN internucléosomique causée par la CD et Susp. (Vachon et al., 2002; Harnois et al., 2004). Contrairement à ce qui a été depuis longtemps retrouvé chez plusieurs types cellulaires (Schaller et al., 1994; Cobb et al., 1994; Xing et al., 1994; Levy et al., 1998), nos analyses montrent que l'activation de Src n'est dépendante ni de Fak ni de la signalisation intégrines-Fak peu importe l'état de différenciation et la lignée des cellules épithéliales intestinales. Il pourrait toutefois y avoir des mécanismes compensatoires d'activation de Src faisant en sorte qu'il n'y aurait pas de changements visibles dans les niveaux d'activation, telle la phosphorylation de la tyrosine 416 par une tyrosine kinase externe (Wu et al., 2005) ou l'activation de Src via une interaction de son domaine SH3 avec Fak (Thomas et al., 1998). En résumé, l'activation des TKs Src chez les cellules épithéliales intestinales peut être dépendante ou indépendante de Fak et/ou de la signalisation intégrines-Fak distinctement selon la kinase, l'état de différenciation et la lignée cellulaire. Ces résultats suggèrent des communications potentielles entre les TKs Src et la

signalisation intégrines-Fak. Ainsi les TKs Src pourraient être impliquées ou non dans les mécanismes de régulation de la survie et/ou d'apoptose des cellules épithéliales intestinales impliquant la signalisation intégrines-Fak (Gauthier et al., 2001; Harnois et al., 2004). Il faut toutefois ne pas oublier les mécanismes de compensation possibles qui peuvent agir dans l'activation des TKs Src et qui semblent aussi être différents selon la kinase.

En résumé pour cette partie, et compte tenu des résultats obtenus jusqu'à présent, les TKs Src semblent situées en aval de Fak, mais seraient indépendantes de l'activation de Fak chez les cellules indifférenciées. Chez les cellules différenciées, les TKs Src seraient situées soit en amont, puisqu'elles semblent contribuer à la phosphorylation de Fak, et/ou situées en aval de Fak puisque l'activation des TKs Src est affectée lors de l'inhibition de Fak et de la signalisation intégrines-Fak pour certaines des TKs Src. Ceci pourrait offrir une protection aux cellules Caco-2/15 différenciées, qui sont d'ailleurs moins susceptibles à entrer en apoptose que les cellules Caco-2/15 indifférenciées lors de l'inhibition de l'activité tyrosine kinase des TKs Src. Comme nous l'avons montré, l'activation de certaines TKs Src (ex : Fyn) peut augmenter lorsque l'activité catalytique est inhibée. Il pourrait alors y avoir activation de Fak et de voies de signalisation menant à la survie des cellules, diminuant ainsi la susceptibilité des cellules différenciées à entrer en apoptose (Gauthier et al., 2001; Vachon et al., 2002). Ceci viendrait peut-être éclaircir le rôle des TKs Src dans les mécanismes de survie des cellules épithéliales intestinales puisqu'elles semblent impliquées distinctement selon l'état de différenciation des cellules épithéliales intestinales. Toutefois cette activation de Fak par les TKs Src chez les

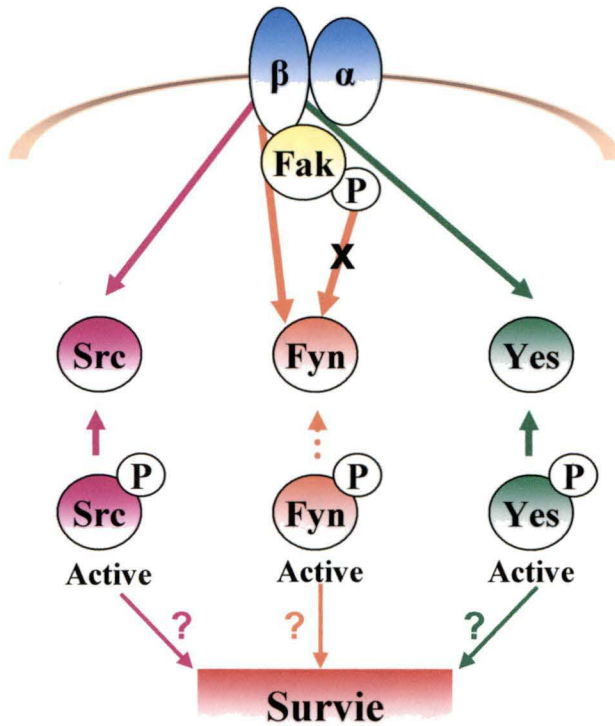
cellules différenciées n'est pas suffisante les pour protéger. En effet, *in vivo* ou lorsqu'il y a induction d'apoptose *in vitro*, soit par la CD ou par la Susp., les cellules différenciées sont plus susceptibles à entrer en apoptose que les cellules indifférenciées (Vachon et al., 2000; Gauthier et al., 2001; Vachon et al., 2002; Dufour et al., 2004).

4. Les interactions directes entre les TKs Src et Fak pourraient affecter l'activation des TKs Src et de Fak et ainsi expliquer les mécanismes compensatoires d'activation observés

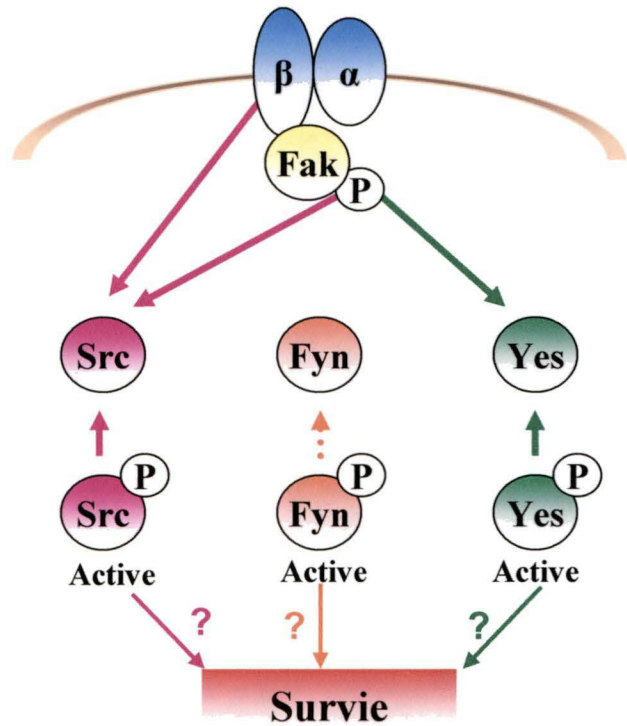
Il a été démontré chez plusieurs types cellulaires que les TKs Src et Fak pouvaient former des complexes (Levy et al., 1998; Schaller et al., 1999; Salazar et Rozengurt, 1999). Afin de continuer à élucider les mécanismes de régulation de la survie impliquant les TKs Src, Fak et/ou la signalisation intégrines-Fak, nous avons analysé s'il y avait des interactions directes entre les TKs Src et Fak. Nous avons analysé si celles-ci étaient distinctes selon l'état de différenciation et si l'inhibition de l'activité des TKs Src, de l'activation de Fak ou de la signalisation intégrines-Fak affectaient ces interactions. Nos résultats démontrent que chez les cellules épithéliales intestinales, les trois TKs Src interagissent avec Fak peu importe le stade de différenciation et la lignée cellulaire. À notre grand étonnement, il y a augmentation des associations entre les TKs Src et Fak lors de l'inhibition de l'activité catalytique des TKs Src à tous les stades de différenciation, à l'exception de Fyn chez les Caco-2/15 indifférenciées en présence d'herbimycine A, de Fyn chez les Caco-2/15 différenciées en présence de PP2 et de Yes chez les HIEC en présence de PP2 (Figure 29). Les augmentations relatives d'association varient toutefois

Figure 29. *Les interactions directes entre les TKs Src et Fak sont régulées distinctement selon l'état de différenciation et la lignée des cellules épithéliales intestinales.* Les trois TKs Src interagissent directement avec Fak peu importe l'état de différenciation et la lignée des cellules épithéliales intestinales. Toutefois ces interactions sont régulées distinctement selon la TKs Src, l'état de différenciation et la lignée cellulaire. Lorsqu'il y a inhibition de l'activité des TKs Src, de Fak et/ou de la signalisation intégrines-Fak, ceci cause la plupart du temps une augmentation des interactions entre Fak et les TKs Src. Certaines hausses d'interactions n'ont été notées qu'avec un des deux inhibiteurs de l'activité tyrosine kinase des TKs Src. Il arrive toutefois qu'il y ait des diminutions d'interactions entre Fak et les TKs Src. Les interactions entre Fak et les TKs Src sont donc régulées distinctement selon la TK Src, l'état de différenciation et la lignée des cellules, mais elles peuvent être des sources d'explication des mécanismes compensatoires d'activation observés au cours de cette étude.

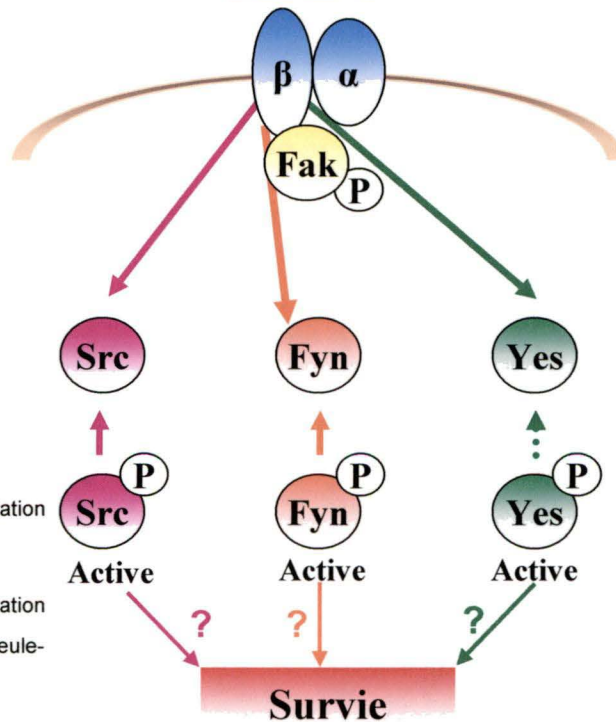
Caco-2/15 Indifférenciées



Caco-2/15 Différenciées



HIEC



Légende

A → B: inhibition de A cause une augmentation d'interaction entre B et Fak

A →• B: inhibition de A cause une augmentation d'interaction entre B et Fak, mais seulement avec un des deux inhibiteurs

A →✕ B: inhibition de A cause une diminution d'interaction entre B et Fak

entre les kinases, le stade de différenciation et la lignée cellulaire, mais elles laissent encore présager des mécanismes compensatoires. Les augmentations d'associations chez les cellules indifférenciées, tant Caco-2/15 que HIEC, peuvent s'effectuer via la phosphotyrosine 397 de Fak puisque son autophosphorylation n'est pas affectée par la perte de l'activité kinase de TKs Src (cette étude). Ces associations ne mènent pas nécessairement à l'activation des TKs Src puisque l'activation de celles-ci chute pour la plupart des TKs Src lors de la perte de l'activité kinase de TKs Src (cette étude). De plus, la phosphorylation de Fak sur la tyrosine 397 n'est pas affectée, démontrant une fois de plus que les TKs Src sont situées en aval de Fak chez les cellules indifférenciées. Toutefois, ces associations pourraient quand même mener à l'autophosphorylation de certaines TKs Src puisque leur activation est inchangée en présence de PP2 et d'herbimycine A. Ce pourrait être un mécanisme de compensation évoqué plutôt. Ces activations pourraient, entre autre, s'effectuer via la liaison de Fak au domaine SH3 des TKs Src (Thomas et al., 1998). Pour les cellules Caco-2/15 différenciées, il y a aussi des augmentations d'association entre les diverses TKs Src et Fak. Ces associations s'effectueraient potentiellement via le domaine SH3 des TKs Src (Thomas et al., 1998) puisque la phosphorylation de la tyrosine 397 de Fak chute en présence de PP2 et d'herbimycine A, donc il n'y aurait pas d'interactions via le domaine SH2. La plupart de ces associations ne mènent pas à l'activation des TKs Src, à l'exception de Fyn en présence d'herbimycine A. Cette augmentation d'activation pourrait expliquer la susceptibilité moins élevée des cellules Caco-2/15 différenciées à entrer en apoptose en présence d'herbimycine A puisqu'il pourrait y avoir activation de voies de survie. Toutefois, les résultats préliminaires concernant l'activité kinase de Fyn montrent qu'elle

chute en présence d'herbimycine A (Vachon et Demers, données non publiées), donc l'activation de voies de survie est peu probable. La hausse d'activation laisse plutôt entrevoir la possibilité que ce pourrait être une tyrosine kinase externe insensible à l'herbimycine A qui phosphorylerait Fyn. Cette phosphorylation n'augmenterait toutefois pas l'activité kinase de Fyn (Wu et al., 2005).

Pour ce qui est des associations entre Fak et les TKs Src lors de l'inhibition de Fak, nos résultats montrent que les associations ne sont pas affectées ni chez les cellules Caco-2/15 indifférenciées ni chez les HIEC, à l'exception de l'association de Fyn qui chute chez les Caco-2/15 indifférenciées. Donc, bien qu'il y ait une augmentation d'activation de Fyn en présence de CD chez les Caco-2/15 indifférenciées (cette étude), cette hausse semble s'effectuer au dépend de l'interaction entre Fak et Fyn via la tyrosine 397 phosphorylée. Ceci suggère une activation de Fyn passant par une interaction directe avec les intégrines (Arias-Salgado, 2003). Chez les Caco-2/15 différenciées, il y a par contre une augmentation d'association entre Fak et Src et une entre Fak et Yes. Elles ne se traduisent toutefois pas par une augmentation d'activation puisque l'activation de Yes diminue et celle de Src reste inchangée. L'inhibition de la signalisation intégrines-Fak, quant à elle, cause une augmentation marquée des associations entre les trois TKs Src et Fak tant chez les cellules Caco-2/15 indifférenciées et les HIEC. Dans les deux cas, ceci se traduit par une augmentation d'activation de Fyn qui pourrait mener à l'activation de voies induisant l'apoptose, comme p38 β , tel que mentionné auparavant. Chez les Caco-2/15 différenciées, la seule hausse d'association notée est entre Src et Fak. Les niveaux d'activation de Src ne sont toutefois pas affectés ou s'ils le sont, c'est que les interactions

empêchent qu'il y ait une baisse d'activation comme celle notée pour les deux autres TKs Src lors du maintien en suspension des cellules (cette étude). L'activation aurait lieu suite à l'interaction de Fak avec le domaine SH3 de Src (Thomas et al., 1998). Comme nous le constatons, les associations des TKs Src avec Fak sont régulées différemment selon la TKs Src impliquée, l'état de différenciation et la lignée cellulaire (Figure 29). Ceci démontre que la régulation de chacune des TKs Src est propre à l'état de différenciation. Ces associations permettent aussi d'expliquer certains mécanismes compensatoires observés pour certaines TKs Src lors de l'inhibition de l'activité tyrosine kinase des TKs Src, de Fak et/ou de la signalisation intégrines-Fak. Tous ces résultats mis ensemble suggèrent que la participation des TKs Src aux mécanismes de régulation de la survie et/ou de l'apoptose/anoïkose des cellules épithéliales intestinales ainsi que leur régulation dans ces mécanismes sont potentiellement distinctes selon la TK Src, l'état de différenciation et la lignée cellulaire.

V – CONCLUSIONS

En conclusion, notre étude indique qu'il existe des distinctions entre Src, Fyn et Yes pour leur expression, leur activation et leurs mécanismes de régulation respectifs et ce, selon l'état de différenciation des cellules épithéliales intestinales humaines. Plusieurs observations appuient ce constat. Premièrement, leurs niveaux d'expression et d'activation sont différents entre les kinases selon l'état de différenciation, suggérant des rôles potentiellement distincts pour chacune selon l'état de différenciation. Les analyses de l'expression et de l'activation ont aussi montré qu'il y a des divergences entre les cellules HIEC et les Caco-2/15 indifférenciées. Elles sont causées possiblement par la nature des cellules. D'autres observations sont venues appuyer ce fait. À l'avenir, les HIEC devront ainsi être analysées séparément des Caco-2/15, du moins lors des études concernant les TKs Src. Deuxièmement, nous avons montré que les TKs Src, en général, sont impliquées dans la survie des cellules épithéliales intestinales. La susceptibilité à entrer en apoptose lors de la perte de l'activité kinase des TKs Src est toutefois variable selon l'état de différenciation et la lignée cellulaire. Nous avons aussi montré que la perte de l'activité kinase des TKs Src affectait différemment les niveaux d'activation de chacune des TKs Src selon l'état de différenciation et la lignée cellulaire. Ceci pourrait peut-être expliquer la susceptibilité à entrer en apoptose variante selon l'état de différenciation et laisse entrevoir des implications propres pour chacune des TKs Src dans les mécanismes de survie. Ces implications pourraient d'ailleurs être différentes selon l'état de différenciation des cellules épithéliales intestinales. Troisièmement, nous avons montré que les TKs Src peuvent être dépendantes ou indépendantes de la

signalisation intégrines-Fak selon la TKs Src, l'état de différenciation et la lignée des cellules épithéliales intestinales. En effet, leur participation à l'activation de Fak ainsi que leur activation dépendante ou indépendante de l'activation de Fak et/ou de la signalisation intégrines-Fak sont divergentes selon la kinase et l'état de différenciation. Elles pourraient donc être impliquées différemment selon la kinase et l'état de différenciation dans les mécanismes de régulation de la survie et/ou d'apoptose passant par la signalisation intégrines-Fak. L'implication différentielle des TKs Src pourrait être une explication à l'existence des mécanismes de survie distincts selon l'état de différenciation des cellules épithéliales intestinales.

Afin de mieux comprendre l'implication des TKs Src dans les mécanismes de régulation de la survie impliquant la signalisation intégrines-Fak, nous avons montré que les associations entre Fak et les TKs Src étaient régulées différemment selon la kinase et l'état de différenciation. De plus, ces associations permettent d'expliquer certains mécanismes compensatoires d'activation des TKs Src observés au cours de notre étude. Ceux-ci étaient propres selon la kinase, l'état de différenciation et la lignée cellulaire. De ces observations, nous pouvons donc affirmer qu'il existe des distinctions pour l'expression, l'activation et les mécanismes de régulation entre chacune des TKs Src selon l'état de différenciation et la lignée cellulaire, notamment dans les mécanismes de régulation de la survie et/ou d'apoptose passant par les cassettes de signalisation intégrines-Fak. Les résultats obtenus jusqu'à présent ne sont qu'un début de compréhension de l'implication des TKs Src dans la survie des cellules épithéliales intestinales. Ces résultats amènent toutefois plusieurs interrogations auxquelles il faudra

répondre dans l'avenir afin de mieux comprendre les différences observées entre les TKs Src. Tout d'abord, il faudra vérifier si les changements observés dans les niveaux d'activation corréleront avec des changements dans les niveaux d'activité kinase en effectuant des essais kinases. Il faudra déterminer précisément laquelle (lesquelles) des TKs Src sont importantes pour la survie des cellules épithéliales intestinales à chacun des stades de différenciation. Ceci pourra être déterminé par transfections/infections de constructions d'ADNc de Fyn, Src et/ou Yes (type sauvage, dominant négatif et/ou constitutif actif) puisque l'utilisation d'inhibiteur seul ne permet pas l'identification d'une kinase précisément.

Pour ce qui est de l'implication des TKs Src dans la signalisation intégrines-Fak, il serait intéressant d'étudier de façon plus approfondie les différents mécanismes d'activation des TKs Src. Ceci pourrait permettre d'élucider les mécanismes compensatoires observés lors de cette étude, comme des interactions directes avec les intégrines ou des interactions impliquant Fak et le domaine SH3 des TKs Src. Un mutant ne contenant pas de domaine SH3 pourrait être utilisé. Ceci permettrait de vérifier si les hausses d'activation observées et les augmentations d'associations avec Fak sont toujours présentes. Par des co-immunoprécipitations, la détection des interactions directes avec les intégrines serait alors possible. L'analyse de l'effet de FRNK («Fak-related non-kinase»), un mutant de Fak correspondant au domaine carboxy-terminal de Fak et ne possédant pas d'activité kinase, permettrait de vérifier si les interactions sont toujours présentes et si elles dépendent oui ou non de l'activité kinase de Fak. De plus, il serait intéressant

d'analyser si d'autres membres de la famille de Fak, ex:Pyk2, peuvent activer les TKs Src.

À plus long terme, il faudrait vérifier s'il n'y a pas d'autres TKs Src impliquées dans la survie des cellules épithéliales intestinales, telle que Rak (Cance et al., 1994). Il serait aussi intéressant d'analyser quelles voies de signalisation sont activées par chacune des TKs Src. Il faudrait notamment vérifier l'état d'activation des voies de la PI3-K/Akt et des MEK/Erk, qui sont impliquées dans les mécanismes de survie distinctement selon l'état de différenciation des cellules épithéliales intestinales. Il pourrait aussi être intéressant de vérifier la phosphorylation des autres tyrosines de Fak que les TKs Src peuvent phosphoryler, comme la tyrosine 577, qui est la cible des TKs Src pour démontrer leur activité catalytique (Wu et al., 2005), ou la tyrosine 925, qui est reconnue pour pouvoir recruter Shc, qui à son tour recrute le complexe Grb2-Sos menant à l'activation de la voie de MEK/Erk (Cornillon et al., 2003).

Toutes ces expériences permettraient de mieux comprendre l'implication réelle des TKs Src dans les mécanismes de survie et/ou d'apoptose/anoïkose à chacun des stades de différenciation des cellules épithéliales intestinales. Éventuellement, une meilleure compréhension de l'implication des TKs Src dans la survie des cellules épithéliales intestinales permettra de cibler certaines protéines à inhiber pour contrecarrer l'acquisition de résistance à l'anoïkose retrouvée chez les cellules du cancer du côlon. Le potentiel cancéreux pourrait ainsi être diminué par des traitements ciblant les protéines spécifiquement.

REMERCIEMENTS

Je tiens d'abord à remercier le Dr Pierre H. Vachon pour m'avoir permis d'effectuer ma maîtrise dans son laboratoire. Je remercie également le Dr J.S. Brugge pour nous avoir fourni des outils essentiels à notre étude. Je salue tous les professeurs, membres du personnel et étudiant(e)s du département que j'ai côtoyés au cours de ma maîtrise. Un merci tout particulier à Anne Vézina, Pierre Pothier et Dominique Jean pour leur aide technique. Je salue ma compagne de travail et amie Marie-Josée Demers avec qui j'ai eu beaucoup de plaisir et qui était toujours là pour m'encourager, même dans les moments plus ardues. Comment oublier les beaux moments partagés, dont nos nombreux fous rires. J'exprime toute ma reconnaissance envers les membres de ma famille pour leur soutien et leurs encouragements depuis le tout début des mes études universitaires. En terminant, j'exprime toute ma gratitude à mon copain Frédéric pour son soutien, ses encouragements, sa compréhension, sa patience et surtout pour son amour depuis le tout début de ma maîtrise.

BIBLIOGRAPHIE

- Abram C.L. et Courtneidge S.A. (2000), Src family tyrosine kinases and growth factor signaling., *Exp. Cell Res.* 254:1-13.
- Adam J.M. et Cory S. (1998), The Bcl-2 protein family : arbiters of cell survival., *Science* 281:1322-1326.
- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K. et Walter P. (2002), *Molecular Biology of the Cell*. 4th ed., Garland Science, New York, p.1010-1024.
- Aliaga J.C., Deschênes C., Beaulieu J.-F., Calvo E.L. et Rivard N. (1999), Requirement of the MAP kinase cascade for cell cycle progression and differentiation of human intestinal cells., *Am. J. Physiol.* 277:G631-41.
- Anderson P. (1997), Kinase cascades regulating the entry into apoptosis., *Microbiol. Mol. Rev.* 61: 33-46.
- Arias-Salgado E.G., Lizano S., Sarkar S., Brugge J.S., Ginsberg M.H. et Shattil S.J. (2003), Src kinase activation by direct interaction with the integrin β cytoplasmic domain., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:13298–13302.
- Bachelder R.E., Ribick M.J., Marchetti A., Falcioni R., Soddu S., Davis K.R. et Mercurio A.M. (1999), p53 inhibits $\alpha 6 \beta 4$ integrin survival signaling by promoting the caspase-3-dependent cleavage of AKT/PKB., *J. Cell Biol.* 147:1063-1072.
- Bain J., McLauchlan H., Elliott M. et Cohen P. (2003), The specificities of protein kinases inhibitors : an update., *Biochem. J.* 371:199-204.
- Barberis L., Wary K.K., Fiucci G., Liu F., Hirsch E., Brancaccio M., Altruda F., Tarone G. et Giancotti F.G. (2000), Distinct roles of the adaptor protein Shc and focal adhesion kinase in integrin signaling to ERK., *J Biol Chem* 275:36532-36540.
- Barnekow A. et Gessler M. (1986), Activation of the pp60c-src kinase during differentiation of monomyelocytic cells in-vitro., *EMBO J.* 5:701.
- Beaulieu J.-F. et Quaroni A. (1991), Clonal analysis of sucrase-isomaltase expression in the human colon adenocarcinoma Caco-2 cells., *Biochem J.* 280:599-608.
- Biggs W.H., Meisenhelder J., Hunter T., Cavenee W.K. et Arden K.C. (1999), Protein kinase B-Akt-mediated phosphorylation promotes nuclear exclusion of the winged helix transcription factor FKHR1., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:7421-7426.

- Blume-Jensen P., Janknecht R. et Hunter T. (1998), The kit receptor promotes cell survival via activation of PI 3-kinase and subsequent Akt-mediated phosphorylation of Bad on Ser136., *Curr. Biol.* 8:779-782.
- Boggon T.J. et Eck M.J. (2004), Structure and regulation of Src family kinases., *Oncogene* 23:7918-7927.
- Bolen J.B. et Brugge J.S. (1997), Leucocyte protein tyrosine kinases : potential targets for drug discovery., *Annu. Rev. Immunol.* 15:371-404.
- Boudreau N., Sympson C.J., Werb Z. et Bissel M.J. (1995), Suppression of ICE and apoptosis in mammary epithelial cells by extracellular matrix., *Science* 267:891-893.
- Bromann P.A., Korkoya H. et Courtneidge S.A. (2004), The interplay between Src family kinases and receptor tyrosine kinases., *Oncogene* 23(48):7957-7968.
- Brown M.T. et Cooper J.A. (1996), Regulation, substrates and functions of Src., *Biochem. Biophys. Acta.* 1287:121-149.
- Brugge J.S., Cotton P.C., Queral A.E., Barrett J.N., Nonner D. et Keane R.W. (1985), Neurones express high levels of a structurally modified activated form of pp60^{c-src}., *Nature* 316:554-557.
- Brunet A., Bonni A., Zigmond M.J., Lin M.Z., Juo P., Hu L.S., Anderson M.J., Arden K.C., Blenis J. et Greenberg M.E. (1999), Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor., *Cell* 96:857-868.
- Burridge K. et Chrzanowska-Wodnicka M. (1996), Focal adhesions, contractility and signaling., *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 12:463-518.
- Calalb M.B., Polte T.R. et Hanks S.K. (1995), Tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase at sites in the catalytic domain regulates kinase activity: a role for Src family kinases., *Mol Cell Biol.* 15(2):954-963.
- Cance W.G., Craven R.J., Bergman M., Xu L., Alitalo K. et Liu E.T. (1994), Rak, a novel nuclear tyrosine kinase expressed in epithelial cells., *Cell Growth Differ.* 5:1347-1355.
- Cardone M.H., Roy N., Stennicke H.R., Salvasen G.S., Franke T.F., Stanbridge E., Frisch S. et Reed J.C. (1998), Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation., *Science* 282:1318-1321.
- Cartwright C.A., Simantov R., Kaplan P.L., Hunter T. et Eckhart W. (1987), Alterations in pp60c-src accompany differentiation in neurons from rat embryo striatum., *Mol. Cell. Biol.* 7:1830-1840.

Cartwright C.A., Coad C.A. et Egbert B.M. (1994), Elevated c-Src tyrosine kinase activity in premalignant epithelia of ulcerative colitis., *J. Clin. Invest.* 93:509-515.

Chan T.O., Rittenhouse S.E. et Tsichlis P.N. (1999), AKT/PKB and other D3 phosphoinositide-regulated kinases : kinase activation by phosphoinositide-dependent phosphorylation., *Ann. Rev. Biochem.* 68:965-1014.

Chen H.C., Appeddu P.A., Isoda H. et Guan J.L. (1996), Phosphorylation of tyrosine 397 in focal adhesion kinase is required for binding phosphatidylinositol 3-kinase., *J. Biol. Chem.* 271:26329-26334.

Cheng E.H.Y., Kirsch D.G., Clem R.J., Ravi R., Kastan M.B., Bedi A., Ueno K. et Hardwick J.M. (1997), Conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector by caspases., *Science* 278:1966-1968.

Clark E.A. et Brugges J.S. (1995), Integrins and signal transduction pathways : The road taken., *Science* 268:233-239.

Clem R.J., Cheng E.H.Y., Karp C.L., Kirsch D.G., Ueno K., Takahasi A., Kastan M.B., Griffin D.E., Earnshaw W.C., Veluona M.A. et Hardwick J.M. (1998), Modulation of cell death by Bcl-X_L through caspase interaction., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:554-559.

Cobb B., Schaller M., Leu T. et Parsons J.T. (1994), Stable association of pp60src and p59fyn with the focal adhesion-associated protein tyrosine kinase, pp125FAK., *Mol. Cell. Biol.* 14:147-155.

Cooper J.A., Gould K.L., Cartwright C.A. et Hunter T. (1986), Tyr 527 is phosphorylated in pp60^{c-Src} : implication for regulation., *Science* 231:1431-1434.

Coppolino M.G. et Dedhar S. (2000), Bi-directional signal transduction by integrin receptors., *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 32:171-188.

Cornillon J., Campos L. et Guyotat D. (2003), Focal adhesion kinase (FAK), une protéine aux fonctions multiples., *Med. Sci.* 19(6-7):743-752.

Cory S. et Adams J.M. (2002), The Bcl-2 family : regulators of the cellular life-or-death switch., *Nat. Rev. Cancer* 2(9):647-656.

Cross T.G., Scheel-Toellner D., Henriquez N.V., Deacon E., Salmon M. et Lord L.M. (2000), Serine-threonine protein kinases and apoptosis., *Exp. Cell Res.* 256:34-41.

Danielian, S. (1993), Les tyrosine kinases de la famille Src : propriétés et rôles dans la cellule., *Pathol. Biol.* 41(7):619-635.

- Datta S.R., Dudek H., Tao X., Masters S., Fu H., Gotoh Y. et Greenberg M.E. (1997), Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery., *Cell* 91:231-241.
- Datta S.R., Brunet A. et Greenberg M.E. (1999), Cellular survival : a play in three Akts., *Genes Dev.* 13:2905-2927.
- Datta S.R., Katsov A., Hu L., Petros A., Fesik S.W., Yaffe M.B. et Greenberg M.E. (2000), 14-3-3 proteins and survival kinases cooperate to inactivate BAD by BH3 domain phosphorylation., *Mol. Cell* 6:41-51.
- Degli Esposti M. (2004), Mitochondria in apoptosis: past, present and future., *Biochem. Soc. Trans.* 32(Pt3):493-495.
- Dehm S.M. et Bonham K. (2004), SRC gene expression in human cancer : the role of transcription activation., *Biochem. Cell Biol.* 82:263-274.
- Del Peso L., Gonzalez-Garcia M., Page C., Herrera R. et Nuñez G. (1997), Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt., *Science* 278:687-689.
- Dufour G., Demers M.-J., Gagné D., Dydensborg A.B., Teller I.C., Bouchard V., Degongre I., Beaulieu J.-F., Cheng J.Q., Fujita N., Tsuruo T., Vallée K. et Vachon P.H. (2004), Human Intestinal Epithelial Cell Survival and Anoikis : Differentiation state-distinct regulation and roles of protein kinase B/Akt isoforms., *J Biol Chem.* 279(42):44113-44122.
- Duxbury M.S., Ito H., Ashley S.W. et Whang E.E. (2004), CEACAM6 cross-linking induces caveolin-1-dependent, Src-mediated focal adhesion kinase phosphorylation in BxPC3 pancreatic adenocarcinoma cells., *J. Biol Chem.* 279(22):23176-23182.
- Eide B.L., Turck C.W. et Escobedo J.A. (1995), Identification of Tyr-397 as the primary site of tyrosine phosphorylation and pp60src association in the focal adhesion kinase, pp125FAK., *Mol. Cell. Biol.* 15:2819-2827.
- Eliceiri B.P. (2001), Integrin and growth factor receptor crosstalk., *Circ Res.* 89:1104-1110.
- Ellis R.E., Yuan J.Y. et Horvitz H.R. (1991), Mechanisms and functions of cell death., *Annu. Rev. Cell Biol.* 7:663-698.
- Fogh J., Fogh J.M. et Orfeo T. (1977), One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice., *J. Natl. Cancer Inst* 59:221-226.
- Frame M.C. (2002), Src in cancer : Deregulation and consequences for cell behaviors., *Biochem. Biophys. Acta.* 1602:114-130.

- Frisch S.M. et Francis H. (1994), Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis., *J. Cell Biol.* 124:619-626.
- Frisch S.M., Vuory K., Ruoslahti E. et Chan-Gui P.Y. (1996), Control of adhesion-dependent cell survival by focal adhesion kinase., *J. Cell Biol.* 134:793-799.
- Frisch S.M. et Ruoslahti E. (1997), Integrins and anoikis, *Curr. Opin. Cell Biol.* 9:701-706.
- Frisch S.M. (1999), Methods for studying anoikis. Dans: *Methods in Molecular Biology*, vol. 129: Integrin protocols. Howlett AR, éd. Humana Press, Totowa. p.251-256.
- Frisch S.M. et Screaton R.A. (2001), Anoikis mechanisms., *Curr. Opin. Cell Biol.* 13:555-562.
- Gardner A.M. et Johnson G.L. (1996), Fibroblast growth factor-2 suppression of tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis requires Ras and the activation of mitogen-activated protein kinase., *J. Biol. Chem.* 271:14560-14566.
- Gauthier R., Harnois C., Drolet J.-F., Reed J.C., Vézina A. et Vachon P.H. (2001), Human intestinal epithelial cell survival : differentiation state-specific control mechanisms., *Am. J. Physiol Cell Physiol.* 280:C1540-C1554.
- Giancotti F.G. et Ruoslahti E. (1999), Integrin signaling., *Science* 285:1028-1032.
- Glenney J.R. Jr et Zokas L. (1989), Novel tyrosine kinase substrates from Rous sarcoma virus-transformed cells are present in the membrane skeleton., *J. Cell Biol.* 108:2401-2408.
- Golubovskaya V.M., Gross S., Kaur A.S., Wilson R.I., Xu L.-H., Yang X.H. et Cance W.G. (2003), Simultaneous inhibition of focal adhesion kinase and Src enhances detachment and apoptosis in colon cancer cell lines., *Mol. Cancer Res.* 1:755-764.
- Grossmann J., Mohr S., Lapetina E.G., Fiocchi C. et Levine A.D. (1998), Sequential and rapid activation of select caspases during apoptosis of normal intestinal epithelial cells., *Am. J. Physiol.* 274:G1117-G1124.
- Grossmann J. (2002), Molecular mechanisms of "detachment-induced apoptosis-anoikis", *Apoptosis* 7:247-260.
- Hale A., Smith C., Sutherland L., Stoneman V., Langthorne V., Culhane A. et Williams G. (1996), Apoptosis : molecular regulation of cell death., *Eur. J. Biochem.* 236:1-26.
- Han J., Lee J.D., Bibbs L. et Ulvitch R.J. (1994), A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells., *Science* 265:808-811.

- Hanke J.H., Gardner J.P., Dow R.L., Changelian P.S., Brissette W.H., Weringer E.J., Pollok B.A. et Connelly P.A. (1996), Discovery of a novel, potent, and Src family-selective tyrosine kinase inhibitor. Study of Lck- and FynT-dependent T cell activation., *J. Biol. Chem.* 271(2):695-701.
- Harnois C., Demers M.-J., Bouchard V., Vallée K., Gagné D., Fujita N., Tsuruo T., Vézina A., Beaulieu J.-F., Côté A. et Vachon P.H. (2004), Human intestinal epithelial crypt cell survival and death : Complex modulations of Bcl-2 homologs by Fak, PI3-K/Akt-1, MEK/Erk, and p38 signaling pathways., *J. Cell. Physiol.* 198(2):209-222.
- Hazzalin C.A., Cano E., Cuenda A., Barratt M.J., Cohen P. et Mahadevan L.C. (1996), p38/RK is essential for stress-induced nuclear responses : JNK/SAPK and c-jun ATF-2 phosphorylation are insufficient., *Curr. Biol.* 6:1028-1031.
- Holmstrom T.H., Chow S.C., Elo I., Coffey E.T., Orrenius S., Sistonen L. et Eriksson J.E. (1998), Suppression of Fas/APO-1-mediated apoptosis by mitogen-activated kinase signaling., *J. Immunol.* 160:2626-2636.
- Hungerford J.E., Compton M.T., Matter M.L., Hoffstrom B.G. et Otey C.A. (1996), Inhibition of pp125FAK in cultured fibroblasts results in apoptosis., *J. Cell. Biol.* 135:1383-1390.
- Hynes R.O. (1992), Integrins : versatility, modulation, and signaling in cell adhesion., *Cell* 69:11-25.
- Igaki T. et Muria M. (2004), Role of Bcl-2 family members in invertebrates., *Biochem. Biophys. Acta.* 1644:73-81.
- Ilic D., Almeida E.A., Schlaepfer D.D., Dazin P., Aizawa S. et Damsky C.H. (1998), Extracellular matrix survival signals transduced by focal adhesion kinase suppress p53-mediated apoptosis., *J Cell. Biol.* 143:547-560.
- Jacobson M.D., Weil M. et Raff M.C. (1997), Programmed cell death in animal development., *Cell* 88:347-354.
- Jones D.T., Addison E., North J.M., Lowdell M.W., Hoffbrand A.V., Mehta A.B., Ganeshaguru K., Folarin N.I. et Wickremasinghe R.G. (2004), Geldanamycin and herbimycin A induce apoptotic killing of B chronic lymphocytic leukemia cells and augment the cells' sensitivity to cytotoxic drugs., *Blood* 103(5):1855-1861.
- Jost M., Huggett T.M., Kari C., Boise L.H. et Rodeck U. (2001), Epidermal growth factor receptor-dependent control of keratinocyte survival and Bcl-X_L expression through a MEK-dependent pathway., *J. Biol. Chem.* 276(9):6320-6326.

- Kaplan K.B., Bibbins K.B., Swedlow J.L., Arnaud M., Morgan D.O. et Varmus H.E. (1994), Association of the amino-terminal half of c-Src with focal adhesion alters their properties and is regulated by phosphorylation of tyrosine 527., *EMBO J.* 13:4745-4756.
- Katso R., Okkenhaug K., Ahmadi K., White S., Timms J. et Waterfield M.D. (2001), Cellular function of phosphoinositide 3-kinases: implications for development, homeostasis, and cancer., *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 17:615-675.
- Kinoshita T., Shirouzu M., Kamiya A., Hashimoto K., Yokoyama S. et Miyajima A. (1997), Raf/MAPK and rapamycin-sensitive pathways mediate the anti-apoptotic functions of p21Ras in Il-3-dependent hematopoietic., *Oncogene* 15:619-627.
- Kohn A.D., Takeuchi F. et Roth R.A. (1996), Akt, a pleckstrin homology domain containing kinase, is activated primarily by phosphorylation., *J. Biol. Chem.* 271(36):21920-21926.
- Kops G.J., De Ruiter N.D., De Vrie-Smits A.M., Powell D.R., Bos J.L. et Burgering B.M. (1999), Direct control of the Forkhead transcription factor AFX by protein kinase B., *Nature* 398:630-634.
- Kroemer G., Petit P., Zamzami N., Vayssiere J.L. et Mignotte B. (1995), The biochemistry of programmed cell death., *FASEB J.* 9:1277-1287.
- Kumar C.C. (1998), Signaling by integrin receptors., *Oncogene.* 17:1365-1373.
- Kyriakis J.M. et Avrunch J. (2001), Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation., *Physiol. Rev.* 81:807-869.
- Laprise P., Poirier È.-M., Vézina A., Rivard N. et Vachon P.H. (2002), Merosin-Integrin promotion of skeletal myofiber cell survival : Differentiation State-distinct involvement of p60^{Fyn} tyrosine kinase and p38 α stress-activated MAP kinase., *J. Cell. Physiol.* 191:69-81.
- Lawson B., Brewer J. et Hendershot L.M. (1998), Geldanamycin, an hsp90/GRP94-binding drug, induces increased transcription of endoplasmic reticulum (ER) chaperones via the ER stress pathway., *J. Cell. Physiol.* 174:170-178.
- Lee J., Wang Z.Y., Luoh S.M., Wood W.I. et Scaden D.T. (1994), Cloning of FRK, a novel human intracellular SRC-like tyrosine kinase encoding gene., *Gene* 138:247-251.
- Le Gall M., Chambard J.-C., Breittmayer J.-P., Grall D., Pouyssegur J. et Van Obberghen-Schilling E. (2000), The p42/p44 MAP kinase pathway prevent apoptosis induced by anchorage and serum removal., *Mol. Biol. Cell* 11:1103-1112.

- Lévy P., Robin H., Kornprobst M., Capeau J. et Cherqui G. (1998), Enterocytic differentiation of the human Caco-2 cell line correlate with alteration in integrin signaling., *J. Cell. Physiol.* 177:618-627.
- Li L., Okura M. et Imamoto A. (2002), Focal adhesions require catalytic activity of Src family kinases to mediate integrin-matrix adhesion., *Mol. Cell Biol.* 22(4):1203-1217.
- Li P., Nijhawan D., Budihardjo I., Srinivasula S.M., Ahmad M., Alnemri E.S. et Wang X. (1997), Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/capase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade., *Cell* 79:479-489.
- Lipfert L., Haimovitch B., Schaller M.D., Cobb J.S., Parsons J.T. et Brugge J.S. (1992), Integrin-dependent phosphorylation and activation of the protein tyrosine kinase pp125FAK in platelets., *J. Cell. Biol.* 119:905-912.
- Lipsich L.A., Lewis A.J. et Brugge J.S. (1983), Isolation of monoclonal antibodies that recognize the transforming proteins of avian sarcoma viruses., *J. Virol.* 48(2):352-360.
- Lizcano J.M., Morrice N. et Cohen P. (2000), Regulation of BAD by cAMP-dependent protein kinase is mediated via phosphorylation of a novel site, Ser155., *Biochem. J.* 349:547-557.
- Loza-Coll M.A., Rosen K., Ladeda V. et Filmus J. (2002), Increased Bcl-X_L expression mediates par v-Src-induced resistance to anoikis in intestinal epithelial cells., *Oncogene* 21:2908-2913.
- Loza-Coll M.A., Perera S., Shi W. et Filmus J. (2005), A transient increase in the activity of Src-family kinases induced by cell detachment delays anoikis of intestinal epithelial cells., *Oncogene* 24:1727-1737.
- Luttrell D.K. et Luttrell L.M. (2004), Not so strange bedfellows: G-protein-coupled receptors and Src family kinases., *Oncogene* 23(48): 7969-7978.
- Luttrell D.K., Luttrell L.M. et Parson S.J. (1988), Augmented mitogenic responsiveness to epidermal growth factor in murine fibroblasts that overexpress p60^{c-Src}., *Mol. Cell Biol.* 8:497-501.
- Martin G.S. (2001), The hunting of the Src., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2(6):467-475.
- McLean G.W., Komiyama N.H., Serrels B., Asano H., Reynolds L., Conti F., Hodivala-Dilke K., Metzger D., Chambon P., Grant S.G. et Frame M.C. (2004), Specific deletion of focal adhesion kinase suppresses tumor formation and blocks malignant progression., *Genes Dev.* 18(24) :2998-3003.

Ménard D. et Beaulieu J.-F. (1994), Human intestinal brush border membrane hydrolase. Dans: *Membrane Physiopathology*, Bkaily G., ed. Kluwer Academic Press, Norwell. p. 319-341.

Meredith J.E., Fazeli B. et Schwartz M.A. (1993), The extracellular matrix as a cell survival factor., *Mol. Biol. Cell* 4:953-961.

Muchmore S.W., Sattler M., Liang H., Meadows R.P., Harlan J.E., Yoon H.S., Nettesheim D., Chang B.S., Thompson C.B., Wong S.L., Ng S.L. et Fesik S.W. (1996), X-ray and NMR structure of human Bcl-X_L, an inhibitor of programmed cell death., *Nature* 381:335-341.

Muslin A.J., Tanner J.W., Allen P.M. et Shaw A.S. (1996), Interaction of 14-3-3 with signaling proteins is mediated by the recognition of phosphoserine., *Cell* 84:889-897.

Nada S., Okada M., MacAuley A., Cooper J.A. et Nakagawa H. (1991), Cloning of a complementary DNA for a protein-tyrosine kinase that specifically phosphorylate a negative regulatory site of p60^{c-Src}., *Nature* 351:69-72.

Oberg-Welsh C. et Welsh M. (1995), Cloning of BSK, a murine FRK homologue with a specific pattern of tissue distribution., *Gene* 152:239-242.

Pageot L.-P., Perreault N., Basora N., Francoeur C., Magny P. et Beaulieu J.-F. (2000), Human cell models to study small intestinal functions: recapitulation of the crypt-villus axis., *Microsc. Res. Tech.* 49:394-406.

Park D.J., Min H.K. et Rhee S.G. (1991), IgE-induced tyrosine phosphorylation of phospholipase C-gamma 1 in rat basophilic leukemia cells., *J. Biol. Chem.* 266:24237-24240.

Park J. et Cartwright C.A. (1995), Src activity increases and Yes activity decreases during mitosis of human colon carcinoma cells., *Mol. Cell Biol.* 15:2374-2382.

Parsons S.J. et Parsons J.T. (2004), Src family kinases, key regulators of signal transduction., *Oncogene* 23: 7906-7909.

Pena S.V., Melhem M.F., Meisler A.I. et Cartwright C.A. (1995), Elevated c-Yes tyrosine kinase activity in premalignant lesions of the colon., *Gastroenterology* 108:117-124.

Perreault N. et Beaulieu J.-F. (1996), Use of the dissociating enzyme thermolysin to generate viable human normal intestinal epithelial cells cultures., *Exp. Cell Res.* 224:354-364.

Perreault N. et Beaulieu J.-F. (1998), Primary culture of fully differentiated and pure human intestinal epithelial cells., *Exp. Cell Res.* 245:34-42.

Perterson G.L. (1977), A simplification of the protein assay method of Lowry et al. Which is more generally applicable., *Anal. Biochem.* 83:346-356.

Philchenkov A. (2004), Caspases : potential targets for regulating cell death., *J. Cell. Mol. Med.* 8(4):432-444.

Pinto M., Robine-Léon S., Appray M.D., Keding M., Triadou N., Dussaulx E., Lacroix B., Simon-Assmann P., Haffen K., Fogh J. et Zweibaum A. (1983), Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture., *Biol Cell* 47:323-330.

Playford M.P. et Schaller M.D. (2004), The interplay between Src and integrins in normal and tumor biology., *Oncogene* 23:7928-7946.

Potten C.S. (1997), Epithelial cell growth and differentiation II. Intestinal apoptosis., *Am. J. Physiol.* 273:G253-G257.

Rapp U.R., Rennefahrt U. et Troppmair J. (2004), Bcl-2 proteins: master switches at the intersection of death signaling and the survival control by Raf kinases., *Biochem. Biophys. Acta.* 1644:149-158.

Reed J.C. (1994), Bcl-2 and the regulation of programmed cell death., *J. Cell Biol.* 124:1-5.

Reinehr R., Becker S., Höngen A. et Häussinger D. (2004), The Src family kinase Yes triggers hyperosmotic activation of the epidermal growth factor receptor and CD95., *J. Biol. Chem.* 279:23977-23987.

Richardson A. et Parson J.T. (1996), A mechanism for regulation of the adhesion-associated protein tyrosine kinase pp125FAK., *Nature* 380:538-540.

Robbins S.M., Quintrell N.A. et Bishop J.M. (1995), Myristoylation and differential palmitoylation of the HCK protein-tyrosine kinases govern their attachment to membranes and association with caveolae., *Mol. Cell Biol.* 15:3507-3515.

Rodriguez-Fernandez J.L. et Rozengurt E. (1996), Bombesin, bradykinin, vasopressin, and phorbol ester rapidly and transiently activate Src family tyrosine kinases in Swiss 3T3 cells., *J. Biol. Chem.* 271:27895-27901.

Rokudai S., Fujita N., Hashimoto Y. et Tsuruo T. (2000), Cleavage and inactivation of antiapoptotic Akt/PKB by caspases during apoptosis., *J. Cell. Physiol.* 182:290-296.

Ruoslahti E. et Reed J.C. (1994), Anchorage dependence, integrins, and apoptosis., *Cell* 77:477-478.

Saini K.S. et Walker N.I. (1998), Biochemical and molecular mechanisms regulating apoptosis., *Mol. Cell Biochem.* 178:9-25.

Salazar E.P. et Rozengurt E. (1999), Bombesin and platelet-derived growth factor induce association of endogenous focal adhesion kinase with Src in intact Swiss 3T3 cells., *J. Biol. Chem.* 274(40):28371-28378.

Schaller M.D., Hildebrand J.D., Shannon J.D., Fox J.W., Vines R.R. et Parson J.T. (1994), Autophosphorylation of the focal adhesion kinase, pp125FAK, directs SH2-dependent binding of pp60src., *Mol. Cell Biol.* 14:1680-1688.

Schaller M.D., Hildebrand J.D. et Parson J.T. (1999), Complex formation with focal adhesion kinase : A mechanism to regulate activity and subcellular localization of Src kinases., *Mol. Biol. Cell* 10(10):3489-3505.

Schlaepfer D., Hanks S., Hunter T. et van de Geer P. (1994), Integrin-mediated signal transduction linked to Ras pathway by GRB2 binding to focal adhesion kinase., *Nature* 372:786-791.

Schlaepfer D., Broome M.A. et Hunter T. (1997), Fibronectin-stimulated signaling from a focal adhesion kinase-c-Src complex : involvement of the Grb2, p130cas, and Nck adaptor proteins., *Mol. Cell Biol.* 17:1702-1713.

Schlaepfer D. et Hunter T. (1998), Integrin signaling and tyrosine phosphorylation : just the FAKs?, *Trends Cell Biol.* 8:151-157.

Segal R.A. et Greenberg M.E. (1996), Intracellular signaling pathways activated by neurotrophic factors., *Annu. Rev. Neurosci.* 19:463-489.

Shupnik M.A. (2004), Crosstalk between steroid receptors and the c-Src-receptor tyrosine kinase pathways: implications for cell proliferation., *Oncogene* 23(48):7979-7989.

Sicheri F., Moarefi I. et Kuriyan J. (1997), Crystal structure of the Src family tyrosine kinase Hck., *Nature*, 385:602-609.

Silva C.M. (2004), Role of STATs as downstream signal transducers in Src family kinase-mediated tumorigenesis. *Oncogene* 23(48):8017-8023.

Stennicke H.R., Jurgensmeier J.M., Shin H., Deveraux Q., Wolf B.B., Yang X., Zhou Q., Ellerby H.M., Ellerby L.M., Bredesen D., Green D.R. et Reed J.C. (1998), Pro-caspase-3 is a major physiologic target of caspase-8., *J. Biol. Chem.* 272:27084-27090.

Sudol M., Alvarez-Buylla A. et Hanafusa H. (1988), Differential developmental expression of cellular yes and cellular src protein in cerebellum., *Oncogene Res.* 2:345-355.

Summy J.M. et Gallick G.E. (2003), Src family kinases in tumor progression and metastasis., *Cancer and Metastasis Reviews* 22:337-358.

Summy J.M., Qian Y., Jiang B.H., Guappone-Koay A., Gatesman A., Shi X. et Flynn D.C. (2003a), The SH4-Unique-SH3-SH2 domains dictate specificity in signaling that differentiate c-Yes from c-Src., *J. Cell Sci.* 116:2585–2598.

Summy J.M., Sudol M., Eck M.J., Monteiro A.N., Gatesman A. et Flynn D.C. (2003b), Specificity in signaling by c-Yes., *Front. Biosci.* 8:185-205.

Tan Y., Ruan H., Demeter M.R. et Comb M.J. (1999), p90(RSK) blocks bad-mediated cell death via a protein kinase C-dependent pathway., *J. Biol. Chem.* 274:34859-34867.

Tan Y., Demeter M.R., Ruan H. et Comb M.J. (2000), BAD ser-155 phosphorylation regulates BAD/Bcl-X_L interaction and cell survival., *J. Biol. Chem.* 275:25865-25869.

Tarnawski A.S. et Szabo I. (2001), Apoptosis-programmed cell death and its relevance to gastrointestinal epithelium : Survival signal from the matrix., *Gastroenterology* 120:294-298.

Thamilselvan V., Patel A., van der Voort van Zyp J. et Basson M.D. (2004), Colon cancer cell adhesion in response to Src kinase activation and actin-cytoskeleton by non-laminar shear stress., *J. Cell. Biochem.* 92:361-371.

Thomas J.W., Ellis B., Boerner R.J., Knight W.B., White G.C. 2nd et Schaller M.D. (1998), SH2- and SH3-mediated interactions between focal adhesion kinase and Src., *J. Biol. Chem.* 273:577–583.

Thomas M.T. et Brugge J.S. (1997), Cellular functions regulated by Src family kinases., *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 13:513-609.

Thornberry N.A. et Lazebnik Y. (1998), Caspases : enemies within., *Science* 281:1312-1316.

Tibbles L.A. et Woodgett J.R. (1999), The stress-activated protein kinase pathways., *Cell Mol. Life Sci.* 55:1230-1254.

Toutant M., Studler J.M., Burgaya F., Costa A., Ezan P., Gelman M. et Girault J.A. (2000), Autophosphorylation of Tyr397 and its phosphorylation by Src-family kinases are altered in focal-adhesion-kinase neuronal isoforms., *Biochem. J.* 348(Pt1):119-128.

Vachon P.H. et Beaulieu J.-F. (1992), Transient mosaic patterns of morphological and functional differentiation in the Caco-2 cell line., *Gastroenterology* 103:414-423.

Vachon P.H., Cardin É., Harnois C., Reed J.C. et Vézina A. (2000), Early establishment of epithelial apoptosis in the developing human small intestine., *Int. J. Dev. Biol.* 44:891-898.

Vachon P.H., Cardin É., Harnois C., Reed J.C., Plourde A. et Vézina A. (2001), Early acquisition of bowel segment-specific Bcl-2 homolog expression profiles during development of the human ileum and colon., *Histo. Hisopathol.* 16:497-510.

Vachon P.H., Harnois C., Grenier A., Dufour G., Bouchard V., Han J., Landry J., Beaulieu J.-F., Vézina A., Dydensborg A.B., Gauthier R., Côté A., Drolet J.-F. et Lareau F. (2002), Differentiation state-selective roles of p38 isoforms in human intestinal epithelial cell anoikis., *Gastroenterology* 123:1980-1991.

Valentijn A.J., Zouq N. et Gilmore A.P. (2004), Anoikis., *Biochem. Soc. Trans.* 32(Pt3):421-425.

Vander Heiden M.G., Chandel N.S., Williamson E.K., Schumacker P.T. et Thompson C.B (1997), Bcl-X_L regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria., *Cell* 91:627-637.

Vanhaesebroeck B. et Alessi D.R. (2000), The PI 3-K-PDK1 connection : more than just a road to PKB, *Biochem. J.* 346:561-576.

Vaux D.L. et Strasser A. (1996), The molecular biology of apoptosis., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:2239-2244.

Veillette A., Bookman A., Horak E.M. et Bolen J.B. (1988), The CD4 and CD8 T cell surface antigens are associated with the internal membrane tyrosine-protein kinase p56lck., *Cell* 55:301-308.

Vuori K., Hirai H., Aizawa S. et Ruoslahti E. (1996), Introduction of p130cas signaling complex formation upon integrin-mediated cell adhesion : a role for Src family kinases., *Mol. Cell Biol.* 16:2606-2613.

Wadhawan V., Karim Z.A., Mukhopadhyay S., Gupta R., Dikshit M. et Dash D. (2004), Platelet storage under in vitro condition is associated with calcium-dependent apoptosis-like lesions and novel reorganization in platelet cytoskeleton., *Arch. Biochem. Biophys.* 422(2):183-190.

Wallen N., Kita H., Weiler D. et Gleich G.J. (1991), Glucocorticoids inhibits cytokine-mediated eosinophil survival., *J. Immunol.* 147:3490-3495.

Wang H.G., Takayama S., Rapp U.R. et Reed J.C. (1996), Bcl-2 interacting protein, Bag-1, binds to and activates the kinase Raf-1., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:7063-7068.

Wang H.G., Rapp U.R. et Reed J.C. (1999), Bcl-2 targets the protein kinase Raf-1 to mitochondria., *Cell* 87:629-638.

Wang Y., Huang S., Sah V.P., Ross J. Jr., Brown J.H., Han J. et Chien K.R. (1998), Cardiac muscle cell hypertrophy and apoptosis induced by distinct member of the p38 mitogen-activated protein kinase family., *J. Biol. Chem.* 273:2161-2168.

Wen L.P., Fahrni J.A., Troie S., Guan J.L., Orth K. et Rosen G.D. (1997), Cleavage of focal adhesion kinase by caspases during apoptosis., *J. Biol. Chem.* 272:26056-26061.

White, E. (1996), Life, death, and the pursuit of apoptosis., *Genes Dev.* 10:1-15.

Whitehead J.P., Clark S.F., Ursø B. et James D.E. (2000), Signaling through the insulin receptor., *Curr. Opin. Cell Biol.* 12:222-228.

Widmann C., Gibson S. et Johnson, G.L. (1998), Caspase-dependent cleavage of signaling proteins during apoptosis. A turn-off mechanism for anti-apoptotic signals., *J. Biol. Chem.* 273:7141-7147.

Windham T.C., Parikh N.U., Siwak D.R., Summy J.M., McConkey D.J., Kraker A.J. et Gallick G.E. (2002), Src activation regulates anoikis in human colon tumor cell lines., *Oncogene* 21:7797-7807.

Wu S.S., Yamauchi K. et Rozengur E. (2005), Bombesin and angiotensin II rapidly stimulate Src phosphorylation at Tyr-418 in fibroblasts and intestinal epithelial cells through a PP2-insensitive pathway., *Cell. Sign.* 17: 93-102.

Wu X., Fan Z., Masui H., Rosen N. et Mendelsohn J. (1995), Apoptosis induced by an anti-epidermal growth factor in a human colorectal carcinoma cell line and its delay by insulin., *J. Clin. Invest.* 95:1897-1905.

Wymann M.P. et Pirola L. (1998), Structure and function of phosphoinositide 3-kinases., *Biochem. Biophys. Acta* 1436:127-150.

Xia Z., Dickens M., Raingeaud J., Davis R.J. et Greenberg M.E. (1995), Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis., *Science* 270:1326-1331.

Xing L., Venegas A.M., Chen A., Garrett-Beal L., Boyce B.F., Varmus H.E. et Schwartzberg P.L. (2001), Genetic evidence for a role for Src family kinases in TNF family receptor signaling and cell survival., *Genes Dev.* 15(2):241-253.

Xing Z., Chen H.C., Nowlen J.K., Taylor S.J., Shalloway D. et Guan J.L. (1994), Direct interaction of v-Src with the focal adhesion kinase mediated by the Src SH2 domain., *Mol. Biol. Cell* 5:413-421.

- Xu L.H., Owens L.V., Sturge G.C., Yang X., Liu E.T., Craven R.J. et Cance W.G. (1996), Attenuation of the expression of the focal adhesion kinase induces apoptosis in tumor cells., *Cell. Growth Differ.* 7:413-418.
- Xu W., Harrison S.C. et Eck M.J. (1997), Tree-dimensional structure of the tyrosine kinase c-Src., *Nature*, 385:595-602.
- Yaffe M.B., Rittinger K., Volinia S., Caron P.R., Aitken A., Leffers H., Gamblin S.J., Smerdon S.J. et Cantley L.C. (1997), The structural basis for 14-3-3 : Phosphopeptide binding specificity., *Cell* 91:961-971.
- Yeh J.H., Hsu S.C., Han S.H. et Lai M.Z. (1998), Mitogen-activated protein kinase kinase antagonized fas-associated death domain protein-mediated apoptosis by induced FLICE-inhibitory protein expression., *J. Exp. Med.* 188:1795-1802.
- Zha J., Harada H., Yang E., Jockel L. et Korsmeyer S.J. (1996), Serine phosphorylation of death agonist Bad in response to survival factor result in binding to 14-3-3 not Bcl-X_L., *Cell* 87:619-628.
- Zhou X.M., Liu Y., Payne G., Lutz R.J. et Chittenden T. (2000), Growth factors inactivate the cell death promoter BAD by phosphorylation of its BH3 domain on ser 155., *J. Biol. Chem.* 275:25046-25051.
- Zou H., Li Y., Liu X. et Wang X. (1999), An APAF-1 cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspases-9., *J. Biol. Chem.* 274:11549-11556.
- Zweibaum A. et Chantret I. (1989), Human colon carcinoma cell lines as in vitro models for the study of intestinal cell differentiation. Dans: Adaptation and development of gastrointestinal function., Smith M.W. et Sepulveda F.V., eds. Manchester University Press, Manchester, England, p. 103-112.